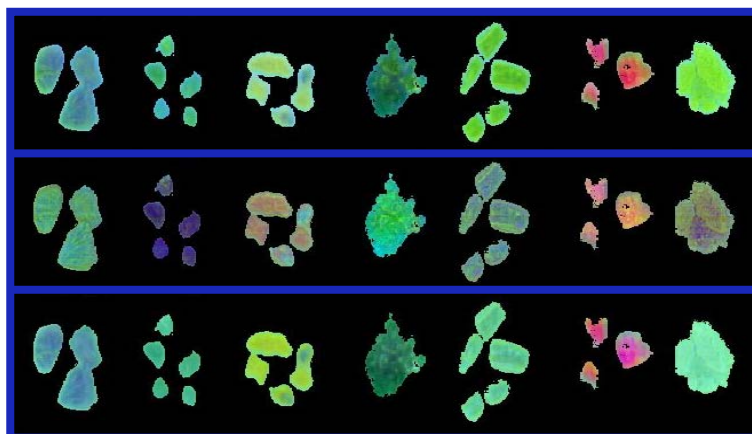


UABUniversitat Autònoma
de Barcelona**MÀSTER UNIVERSITARI
CIÈNCIA I TECNOLOGIA QUÍMIQUES**INICIACIÓ A LA RECERCA
I TREBALL FI DE MÀSTER**AVENÇOS EN L'ESTUDI DE LA LITIASI RENAL
MÈTODES DE CHEMICAL IMAGING I INTEL·LIGÈNCIA ARTIFICIAL
(ANN) PER LA CARACTERITZACIÓ DE CÀLCULS RENALS**

Francisco Blanco Lucena

Directors

Manuel Valiente

Montserrat López Mesas

Departament de Química

Facultat de Ciències

Setembre 2010



**MÀSTER UNIVERSITARI
CIÈNCIA I TECNOLOGIA QUÍMIQUES**

INICIACIÓ A LA RECERCA
I TREBALL FI DE MÀSTER

**AVENÇOS EN L'ESTUDI DE LA LITIASI RENAL
MÈTODES DE CHEMICAL IMAGING I INTEL·LIGÈNCIA ARTIFICIAL
(ANN) PER LA CARACTERITZACIÓ DE CÀLCULS RENALS**

Francisco Blanco Lucena



Departament de Química

Unitat de Química Analítica

Centre Grup de Tècniques de Separació en Química (GTS)

Memòria presentada per superar el Mòdul d'Iniciació a la Recerca i Treball Fi de Màster corresponent al Màster Universitari Ciència i Tecnologia Químiques.

Francisco Blanco Lucena

Vist i plau,

Manuel Valiente Malmagro

Montserrat López Mesas

Bellaterra, 01/09/2010

RECONeixEMENTS

El present treball forma part d'una col·laboració interuniversitària entre el Grup de Tècniques de Separació (Centre GTS), del Departament de Química de la UAB i els centres:

- Dipartimento de Ingegneria Chimica dei Materiali delle Materie Prime e Metallurgia, Università Degli Studi di Roma "La Sapienza", Roma, Itàlia. Acciones Integradas 2009, (IT2009-0024, Prof. Giuseppe Bonifazi)

- Department of Analytical Chemistry, University of Masaryk, Brno, República Txeca. (SAB 2009-0005, Prof. Josef Havel)

AGRAÏMENTS

Ara que tinc la versió definitiva del treball a les meves mans, sembla que al final ha estat possible acabar-lo! Realment ha estat un any intens... He viatjat, he après i, el més important, ho he fet amb els GTSeros.

Espero que us agradi aquesta part del treball, ja que serà la única que llegireu (bé, alguns no)!

A **MV**: De no ser por el jefe, no hubiera entrado en el grupo. De no ser por su carácter, no me hubiera quedado. De no ser por su ayuda, no hubiera podido disfrutar de este año. Por todo eso y por los años que quedan, Gracias Manolo!

A la **LMM** li he de donar les gràcies per la seva ajuda i el temps que m'ha dedicat fins i tot mentre esperava un moment tan important.

A la gent del D, **PR**, **BDG**, **JBA**, espero que continueu venint al lab A a "robar-nos" coses, és bo saber que esteu allà. Als desterrats **JNR**, **RIA**: Per estar per allà sempre que mesuràvem un pH. **AAN**: Qué caipirinha! **LS**: Gràcies per la gran calçotada i chistes, a cual mejor. **AAS**: A mi mentor, tengo que agradecerle, a parte de chistes, palpas y garronchos, lo que me enseñó durante los primeros meses, que es casi todo lo que he aprendido por aquí. **BGL**: Realmente por mucha guarrilla del G que sea, a veces pienso que alomejor sí que es la más cariñosa de GTS, por eso te habré echado de menos mientras estabas en Stanford. **EPS**: Gracias por ser mi compañera de car-sharing, por prestarme tu sitio y por estar siempre dispuesta a tomar una birra con todos. **MAP**: Vas ser la primera amigueta al grup, i continues essent ara la que més em fa riure. Val la pena treballar amb tu cada dia, reietona. **JLG**: Gracias por dedicarme tu tiempo cuando tu tenías tanto trabajo, el tiempo que coincidimos aquí fue genial. **ACS**: Mi compañera de adicción al chocolate en el grupo, me tranquiliza saber que hay alguien que siempre sonríe en el G; te seguiré defendiendo cuando Uri te diga cosas feas. **GUS**: Es genial tener a alguien con ese sentido del humor y con las ideas tan claras por aquí. **OBA**: Company de feina a l'agost, però també company de barbacoes, riure, i coautor de les mascotes del GTS. Estic content que estiguis per aquí. **MAC**: Per demostrar-me que la Jordipedia és millor que la Wikipedia. **MIR**: Perquè a tothom li agrada arribar al matí mig adormit i sentir sempre un amable: Bon dia, rei! **MRC (BEC)**: El meu primer becari, m'has ajudat quan realment ho necessitava. Espero que encara que ens deixes tirats per anar a orgànica, no oblidis on estem quan tinguis ganes de fer un cafè. **NAC**: Thank you for being so nice, and sharing with me laughs, doubts and so many moments during your time here. **AMA**: Holamanda, gracias por estar siempre ahí incluso desde otro edificio, y aunque no te creas que hoy también estás guapa, gracias por todo... Contigo por aquí sí que parece que todo es bonito! **Poritz**: Vielen, vielen Dank für die Hilfe, die du mir immer gegeben hast: beim Wählen die Farben auf dem Deckblatt und beim alles! Du weißt, ich habe dir sehr viel zu danken. Ich hoffe wir lachen wieder. Crec que no ha quedat ni massa horrible ni massa absurd. **A mi mejor amigo de Zamora**: Eres de los que más me ha ayudado siempre y después de tardes apalancados hablando en el lab, domingos por la tarde tomando el sol (y una Estrella) en la playa, un montón de días en el sincrotrón, y muchas más cosas que no caben aquí, tu título se empieza a quedar pequeño. Gracias Dieguín. **Maria de totes les Montserradetes**: Si a algú he d'agrair recolzament dintre i sobretot fora del lab és a tu. Ets de les persones que fa que ser quatre anys un becari-precari valgui la pena. Espero que això segueixi igual i pugui continuar cuinant fajitas a la teva cuina.

Prof. Havel: I feel really grateful for all the help you gave me during the hard days of writing the report. I've learned so much in so little time.

Prof. Bonifazi and Silvia: Thank you for being so nice with me and giving me the chance to stay at your lab in Latina. It's been a great experience and I hope I can repeat it.

Aldo and Laura: You both are awesome. Thank you for your taxi service door-to-door and for letting me join into your everyday life for two weeks.

Gracias a la **família**, por aguantarme cuando he vuelto a casa cansado y de mal humor.

Gràcies a la **gent de la uni**, perquè continuem fent soparets, vacances i riure tant com ho fem!

Ari, gràcies per dir-me sempre que sóc un crack, encara que no ho sigui!

Wien, gra6 per tot, de veres. M'has ajudat una brutor i sempre has volgut escoltar es meus lios.

Agraïments espacials:

A en **Delfín I** i en **Pezón I**: Gràcies per sobreviure i animar el lab durant aquest temps.

He de dir que estic especialment agraït als meus estimats **GATS (C1, C2 i C3)**! Tot i que de vegades m'han fet anar una mica... just de temps, he pogut aprendre moltíssimes coses gràcies a ells. Simplement, no volia que quedessin fora d'aquestes quatre línies.

Al señor/a **FPU**: Por darme una alegría cuando parecía que la noticia no llegaría nunca.

"La vida es una aplastante derrota tras otra, hasta que acabas deseando que se muera Flanders."

Homer J. Simpson

ABSTRACT

La litiasi urinària és un trastorn que implica la formació de precipitats en qualsevol part del tracte urinari. Aquest és un desordre comú que afecta aproximadament a una desena part de la població de la Unió Europea al llarg de la seva vida. A més, durant els cinc anys posteriors a un episodi litiàsic el percentatge de recurrència dels pacients és del 45 al 75%. Aquest trastorn urinari està influït per una gran quantitat de variables, d'origen fisiològic, psicològic i ambiental. Els episodis litiàsics, es poden solucionar espontàniament, amb l'expulsió del càlcul renal, o bé a través de diverses intervencions mèdiques. Els tractaments mèdics derivats de la litiasi urinària; és a dir, la fragmentació del càlcul, intervencions quirúrgiques i tractaments posteriors generen unes grans despeses als sistemes mèdics.

Pels motius exposats, la identificació del desordre que ha originat l'episodi litiàsic és de radical importància, per tal de minimitzar el risc de reincidència. Els mètodes més usats per determinar les causes que desencadenen la formació del càlcul renal són les anàlisis d'orina i l'estudi del càlcul generat. La correcta descripció de la composició i, especialment, l'estructura del càlcul renal pot aportar informació clau sobre les possibles causes de la seva formació, tant de l'inici de nucleació del càlcul com de les successives etapes de creixement cristal·lí.

Tenint en compte aquest darrer aspecte, el present estudi s'ha dirigit a la caracterització de càlculs urinaris mitjançant l'aplicació de metodologies d'imatge química (*Hyperspectral Imaging*), el que va contribuir a determinar les principals característiques espectrals de cada compost majoritari als càlculs renals. D'altra banda, la utilització de mostres de composició coneguda ha possibilitat la creació d'un model amb Xarxes Neuronals Artificials, que permet la classificació de noves mostres de composició desconeguda, de manera més ràpida que el procediment actual.

Aquest treball constitueix una nova contribució a la comprensió de l'estructura de les pedres de ronyó, així com les condicions de la seva formació. Els resultats obtinguts destaquen les possibilitats que presenten les tècniques emprades al camp de la litiasi renal, que permeten complementar els coneixements existents enfocats a millorar la qualitat de vida dels pacients.

GLOSSARI

AUA: Àcid úric anhidre ($C_5H_4N_4O_3$)

AUD: Àcid úric dihidrat ($C_5H_4N_4O_3 \cdot 2 H_2O$)

BRU: Brushita ($CaHPO_4$)

CaOx: Oxalat de calci

COM: Oxalat de calci monohidrat ($CaC_2O_4 \cdot H_2O$)

COD: Oxalat de calci dihidrat ($CaC_2O_4 \cdot 2 H_2O$)

CYS: Cistina ($C_6H_{12}N_2O_4S_2$)

HAP: Hidroxiapatita ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$)

MXC: Barreja de COM i HAP, estructurat en capes

MXD: Barreja de COM i HAP, sense estructura definida

STR: Estruvita ($Mg(NH_4)(PO_4) \cdot 6 H_2O$)

TRA: COD amb transformació total o parcial a COM.

ANN: *Artificial Neural Networks*, Xarxes Neuronals Artificials.

Imatge RGB (*Red-Green-Blue*): Assignació de cadascun dels tres colors (vermell, verd i blau) a tres variables, per obtenir una imatge resultat de la combinació de les seves intensitats relatives. Aquesta imatge també es coneix amb el nom de *False Colour Image*.

FA: *Factor Analysis*, Anàlisi de Factors.

PCA: *Principal Components Analysis*, Anàlisi de Components Principals.

PC: Component Principal, cadascuna de les noves variables obtingudes a l'anàlisi PCA, com a combinació lineal de les variables reals.

RMS: *Root Mean Square*, Càlcul de l'error global del model creat.

ROI: *Region Of Interest*, Zona de la mostra seleccionada per l'observació hiperespectral.

Recidiva: Aparició d'una malaltia en un individu que ja l'ha passada.

ÍNDEX

1. INTRODUCCIÓ	1
1.1. Litiasi Renal	1
1.1.1. Tipus de càlculs renals	2
1.2. Espectroscòpia NIR	4
1.3. <i>Hyperspectral Imaging</i>	5
1.4. Xarxes Neuronals Artificials	6
1.5. Objectius	7
2. PROCEDIMENT EXPERIMENTAL	8
2.1. Equips i reactius	8
2.1.1. Equips i <i>software</i>	8
2.1.2. Mostres	9
2.2. Tècniques analítiques	9
2.2.1. Microscòpia Estereoscòpica	9
2.2.2. Microscòpia Electrònica d'Escombrat (SEM) i Microanàlisi de Raigs X (EDS)	9
2.2.3. <i>Hyperspectral Imaging</i>	10
2.3. Tècniques d'anàlisi de dades	11
2.3.1. Anàlisi de Factors	11
2.3.2. Anàlisi de Components Principals	12
2.3.3. Xarxes Neuronals Artificials	14
2.3.4. Anàlisi d'imatges	15
2.4. Procediment Experimental	15
2.4.1. Preparació de mostres	15
2.4.2. Mesura dels espectres	15
2.4.3. Anàlisi dels espectres	16
3. RESULTATS I DISCUSSIÓ	17
3.1. Classificació dels càlculs renals per Microscòpia Estereoscòpica...	17
3.2. Anàlisi de càlculs renals per SEM	17
3.2.1. EDS	17
3.3. <i>Hyperspectral Imaging</i>	19
3.4. Anàlisi de factors	20
3.5. Anàlisi de Components Principals	20
3.5.1. Anàlisi PCA per a cada tipus de càlcul renal Eliminació de punts anòmals	20
3.5.2. Anàlisi PCA pel conjunt dels 7 tipus de càlculs renals ...	22
3.5.3. Selecció de variables	23
3.6. Tractament d'imatges	26
3.7. Xarxes Neuronals Artificials	27
3.7.1. Optimització de la ANN	27
3.7.2. Resultats del model	28
3.7.3. Ampliació del model a 11 tipus de càlculs renals	29
4. CONCLUSIONS	30
5. BIBLIOGRAFIA	31
6. ANNEXOS	
Annex I. Exemples d'imatges dels càlculs renals analitats	33
Annex II. Representacions dels resultats de PCA sobre cada tipus de càlcul renal, per la detecció de punts anòmals	36

1. INTRODUCCIÓ

En aquest apartat es recullen els aspectes bàsics desenvolupats en aquest estudi, per tal de centrar l'atenció en ells i facilitar la comprensió dels objectius plantejats. Així, introduïm la litiasi renal, incloent la definició de les característiques dels principals tipus de càlculs renals; una descripció dels fonaments de l'espectroscòpia NIR, de la tècnica *Hyperspectral Imaging* i de la metodologia de les Xarxes Neuronals Artificials.

1.1. LITIASI RENAL

La litiasi urinària es defineix com el procés de formació d'un càlcul renal al tracte urinari. Un càlcul renal és una estructura sòlida que es forma com a conseqüència d'una alteració en els paràmetres químics de l'orina i la morfoanatomia renal¹.

Aquesta és una patologia freqüent, ja que entre el 5 i el 12% dels habitants dels països desenvolupats pateixen un procés litiàsic abans dels 70 anys². S'han observat diversos marcadors, com els factors hereditaris o la superior predisposició del sexe masculí a patir aquesta afecció. D'altra banda, existeixen factors de risc, que poden incrementar les probabilitats de desenvolupar un càlcul renal³:

- Dieta: La ingesta de substàncies que promoguin la litiasi renal, així com la manca d'inhibidors de la mateixa.
- Ingesta de líquids: Una menor quantitat de líquids ingerits fa que la diüresi disminueixi, fent que l'orina estigui més concentrada. Aquest és considerat, de fet, un dels principals factors de risc en la litiasi renal.
- Factors climàtics: La pèrdua de líquids, normalment per sudoració, fa que la concentració de totes les espècies en orina augmenti.
- Nivell socioeconòmic: Un poder adquisitiu elevat permet una dieta més rica en proteïnes animals i sucres, que fan augmentar la presència de urats, oxalat i calci a l'orina (promotors de la litiasi). A més, l'estrès també es considera un factor de risc⁴.

La saturació urinària pot veure's incrementada fins al punt de provocar la precipitació d'algun dels compostos que formen el càlcul renal a través d'algun dels següents mecanismes³:

- Augment de la concentració de les espècies químiques pròpies de l'orina, degut a una excreció excessiva o a una diüresi insuficient.
- Modificacions del pH urinari, que afecten l'estabilitat de diverses espècies en solució (p. ex., precipitació de HAP a $\text{pH} > 7$)⁵.

- Disminució de la concentració d'inhibidors del creixement cristal·lí.
- Anatomia renal. Les cavitats de baixa eficiència urodinàmica poden fer que les condicions a una regió local permetin la cristal·lització.

És important remarcar el fet que els factors cinètics poden resultar més determinants que els termodinàmics a l'hora de definir si un component precipitarà o romandrà en fase metaestable en solució⁶.

1.1.1. Tipus de càlculs renals

Existeixen diversos grups de càlculs renals, que es classifiquen segons la naturalesa dels components majoritaris que els formen^{7,8}. És possible distingir fins a 7 grups diferents, així com mescles de diferents compostos, formant estructures definides. A continuació es descriuen les característiques de composició, estructura i condicions de precipitació dels diferents tipus de càlculs:

OXALAT DE CALCI (CaOx)

Tenen com a principal component l'oxalat de calci, tot i que és fonamental distingir entre dues formes d'aquest compost.

COM (Oxalat de Calci Monohidratat): La forma monohidratada d'aquest compost és la més estable termodinàmicament a l'orina⁹. El COM es forma en condicions normals de concentració d'ió calci, però amb un dèficit de capacitat inhibidora. Els càlculs de COM tenen una estructura molt compacta, formada per l'addició de cristalls columnars que creixen en direcció perpendicular al nucli.

Un subgrup de COM que es troba de manera habitual és el format pels càlculs papil·lars, que creixen a partir de la deposició de matèria orgànica o hidroxipatita sobre una lesió prèvia a la superfície interna del ronyó⁶.

COD (Oxalat de Calci Dihidratat): Només els paràmetres cinètics poden explicar la formació de la forma dihidratada de l'oxalat de calci³. La precipitació de COD es dona amb concentració d'inhibidors normal, una alta relació $[Ca^{2+}]/[oxalat^{2-}]$ i un pH superior a 6. La disposició típica del COD és en cristalls bipiramidals que s'agreguen.

FOSFATS DE CALCI

Existeixen dos grups de càlculs que tenen com a component principal un fosfat de calci. El fet que el sistema Ca^{2+} - PO_4^{3-} - Mg^{2+} precipiti amb una forma o l'altra depèn del pH urinari⁹.

HAP (Hidroxipatita): L'ió Mg^{2+} actua com a inhibidor de la precipitació de la hidroxipatita, per competitivitat amb l'ió Ca^{2+} . Així, en presència de quantitats baixes d'ió Mg i $pH > 7$ es poden produir dipòsits de HAP, sobretot en zones de baixa eficiència urodinàmica. Els càlculs de HAP són amorfs, generalment de color blanc i poc compactes.

BRU (Brushita): A pH més àcid (inferior a 5) la fase termodinàmicament estable és la brushita (CaHPO_4). L'estructura habitual d'aquest tipus de càlcul és la d'acumulació de cristalls plans i allargats de BRU.

ALTRES FOSFATS

STR (Estruvita): Els càlculs d'estruvita es componen bàsicament d'una quantitat variable de cristalls d'aquest compost ($\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$), en general dispersos sobre una matriu de HAP¹⁰. No tenen cap estructura definida i precipiten a un pH > 6,5. Els càlculs de STR també es coneixen amb el nom d'infecciosos, ja que es requereix una elevada concentració d'amoni en orina, provinent dels residus del metabolisme de bacteris presents al tracte urinari en cas d'infecció.

ÀCID ÚRIC

AUA (Àcid Úric Anhidre): Les condicions urinàries que provoquen la precipitació d'àcid úric són una concentració elevada d'aquest i un pH < 5,5. Novament es troben dos subgrups de càlculs renals: AUA i AUD¹¹. El primer, l'àcid úric anhidre, és la forma termodinàmicament estable al medi urinari. D'altra banda, el AUD (la forma dihidratada) precipita de manera habitual, tot i que es transforma ràpidament en AUA. Per tant, els càlculs renals acostumen a contenir majoritàriament AUA, tot i que una estructura poc compacta pot revelar un origen de AUD.

ALTRES CÀLCULS

CYS (Cistina): Els càlculs renals de cistina es produeixen únicament als ronyons dels pacients que presenten un desordre al metabolisme d'aquest aminoàcid¹². Representen un percentatge baix (<1%) dintre del global d'incidències de càlcul renal. Tenen aspecte de cera, presenten una alta duresa, sovint requereixen intervenció quirúrgica i solen presentar alta recidiva.

Els grups de càlculs renals formats per combinació de substàncies ja comentades són:

TRA (Transformats): Els càlculs de COD tenen tendència a transformar-se a COM en romandre en contacte amb l'orina. Es poden identificar degut a l'estructura poc compacta que presenten. No s'aprecien els cristalls característics de cap de les formes ja comentades d'oxalat de calci a la seva estructura.

Mixtes: Donat el fet que tant el COD com la HAP precipiten en condicions semblants (concentració de Ca^{2+} elevada i pH alt) és possible trobar càlculs mixtes d'ambdues substàncies. Aquests són càlculs tous i es presenten formant capes alternades de COD i HAP (MXC) o sense una estructura definida (MXD).

De tots ells, els càlculs més habituals són els d'oxalat de calci (incloent COM i COD), tal i com es mostra a la *Figura 1.1*.

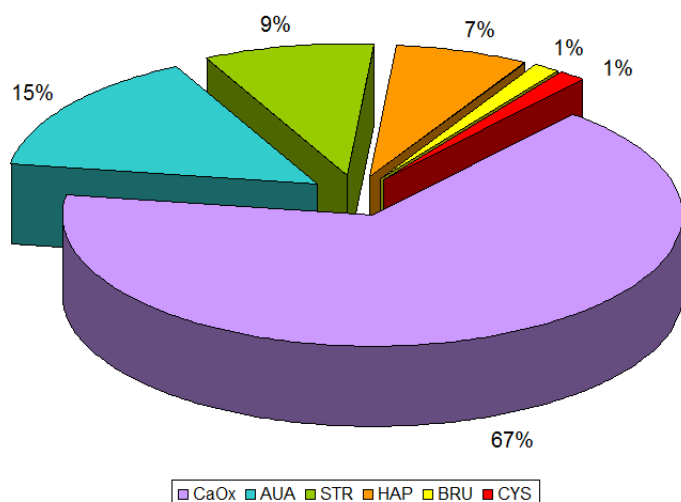


Figura 1.1. Freqüència d'incidència de cada tipus de càlcul renal, per composició².

L'anàlisi de la composició i estructura d'un càlcul renal permet obtenir informació dels paràmetres fisicoquímics de la seva formació. Aquesta classificació resulta de gran importància a la pràctica clínica, ja que el coneixement de les condicions urinàries que van provocar la formació del càlcul possibilita el fet d'establir un tractament per tal d'evitar recidives.

Habitualment la determinació dels paràmetres químics i estructurals dels càlculs renals es fa emprant les tècniques de microscòpia estereoscòpica¹³, SEM⁶ i, eventualment, l'anàlisi a l'infraroig mitjà¹⁴.

1.2. ESPECTROSCÒPIA NIR

La radiació infraroja inclou un ampli rang d'energies que va des dels 780 fins els 10⁶nm. Les longituds d'ona menys energètiques, dels 780 als 2500nm corresponen a la regió NIR (*Near Infrared*)¹⁵. L'espectroscòpia NIR (NIRS) és una tècnica no destructiva de la mostra que permet obtenir informació analítica ràpidament amb un pretractament de mostra mínim, característiques que la fan apta per a la seva aplicació al present estudi, com demostren treballs previs¹⁶.

Una molècula absorbeix radiació IR quan l'energia incident fa que els enllaços rotin i vibrin, induint aquest fenomen un canvi en el vector del moment dipolar net. Les bandes fonamentals es troben a la regió energètica de l'IR mitjà (MIR), essent les bandes que apareixen al NIR sobretons o combinacions de les primeres.

Degut al fet que les transicions NIR són poc probables¹⁵, la seva intensitat és més baixa que la que caracteritza les bandes MIR. D'altra banda, les bandes d'absorció són molt amples, de manera que el solapament de bandes és un fet habitual.

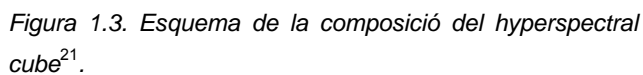
Tal i com mostra la *Figura 1.2*, la major part de les bandes que apareixen al rang del NIR provenen de vibracions d'enllaços O-H, S-H, N-H i C-H.



1.3. *HYPERSPECTRAL IMAGING*

La tècnica *Hyperspectral Imaging*, també coneguda com a *Chemical Imaging*, és fruit de la combinació de les funcions d'una càmera digital amb les d'un espectròmetre. El fet que les dades resultants continguin informació tant espectral com espacial està fent que prengui cada cop més força, aplicant-se a un ampli ventall de camps, com ara l'estudi de materials, la farmàcia o la medicina^{18,19}.

Les dades mesurades formen el conegut com a *hyperspectral cube*²⁰. Aquest té dues dimensions d'un pla que representen les dimensions espacials, mentre que la tercera dimensió és espectral. És a dir, es pot descriure com un cub format per una superfície on es mesura un espectre per a cadascun dels píxels que la defineixen (*Figura 1.3*). Per tant, el cub és una acumulació d'imatges d'una mateixa superfície, cadascuna mesurada a una longitud d'ona diferent. Aquesta disposició permet estudiar la composició i distribució d'espècies a la superfície analitzada.



És un fet destacable la ingent quantitat de dades que conté cada *hyperspectral cube*, format per desenes de milers de píxels. Així, el tractament de dades requereix la utilització de mètodes quimiomètrics de tractament de dades multivariants. A través d'aquests tractaments és possible representar imatges en escala de grisos o RGB que descriguin la composició dels píxels que conformen la superfície.

La combinació de les tècniques NIRS i *Hyperspectral Imaging* permet lligar la robustesa de la primera amb la definició espacial de la segona, obtenint una tècnica polivalent, que presenta unes característiques molt adients per a certes aplicacions, com es mostra a la *Taula 1.1*.

Taula 1.1. Comparació de les tècniques NIRS, RS (Espectroscòpia Raman) i CI (Chemical Imaging)²⁰.

Característica	NIRS	RS	NIR-CI
Definició espacial			√
Informació espectral	√	√	√
Informació de multicomponents	√	√	√
Sensibilitat a components minoritaris			√
Tolerància a la geometria de la mostra	√		√
Quantificació sense necessitat de patrons			√

Les característiques del CI fan que es consideri com una bona opció per tal d'analitzar de manera ràpida els càlculs renals, ja que permet estudiar diferents composicions i també la distribució dels components, trets diferenciadors dels diferents tipus de càlculs.

1.4. XARXES NEURONALS ARTIFICIALS

Les tècniques de reconeixement de pautes inclouen la coneguda com Xarxes Neuronals Artificials (*Artificial Neural Networks*, ANN). Les ANN són programes informàtics que simulen el funcionament del cervell, copiant la mateixa estructura de neurones connectades entre elles i que adquireixen el seu coneixement detectant relacions entre les dades introduïdes, no a través de la programació i l'estadística. Una ANN està formada per múltiples nodes de connexió, que són realment equacions que relacionen les dades d'entrada amb les de sortida²².

Les ANN emprades en aquest treball s'integren dins els mètodes supervisats de reconeixement de pautes, ja que creen els algorismes que formen el model en base a uns resultats coneguts. Així, les ANN "aprenen" a través d'un procés de minimització de l'error en la predicció dels resultats, procés conegut com a aprenentatge.

Comparades amb els mètodes de modelat clàssics, les ANN presenten certes diferències al seu plantejament. Els mètodes clàssics necessiten certs requeriments

del conjunt de dades, com ara que les dades tinguin una distribució normal, i forcen les interaccions a ajustar-se a certes relacions lineals²³. Tot i això, degut als procediments matemàtics clars d'aquests mètodes, és possible analitzar quines són les variables que influeixen més a la classificació final. D'altra banda, les ANN no requereixen aquesta distribució normal de les dades, però donat el fet que el flux de relacions és molt més complex, el funcionament del mètode no és tan evident.

F. Rosenblatt²⁴ va plantejar el primer model matemàtic per simular el procés d'aprenentatge del cervell l'any 1958. A partir d'aquest concepte es van desenvolupar les ANN, essent els camps d'aplicació actuals molt diversos, incloent el farmacèutic i el mèdic²³, entre d'altres. Dintre del camp mèdic, les ANN resulten útils pel diagnòstic de malalties, ja que aquest respon a models no lineals²⁵. Al camp de la urologia també s'han aplicat ja les xarxes neuronals, tot i que amb diferents objectius als del present estudi, com ara el càlcul de la probabilitat de desenvolupar càncer de pròstata²⁶.

1.5. OBJECTIUS

En base al que s'ha descrit al llarg de la introducció es proposen els següents objectius per al present treball:

1. Classificació dels càlculs renals amb les tècniques de Microscòpia Estereoscòpica i Microscòpia Electrònica d'Escombrat.
2. Estudi de la superfície dels càlculs renals amb la tècnica *Chemical Imaging*.
3. Determinació de les variables d'identificació per a cada tipus de càlcul renal.
4. Establir la possibilitat d'emprar ANN per la classificació dels càlculs renals estudiats.

2. PROCEDIMENT EXPERIMENTAL

Aquest apartat recull els principals procediments de treball que s'han desenvolupat durant aquest estudi, duts a terme a dos centres diferents.

- Centre GTS, UAB
- Università di Roma "La Sapienza"

La selecció dels càlculs i el tractament de dades es va realitzar als laboratoris del GTS, a la UAB, mentre que la preparació de les mostres i les mesures espectrals es van fer als laboratoris de la Università di Roma. Les anàlisis amb microscòpia estereoscòpica i SEM es van realitzar a ambdós centres.

S'inclou una descripció del mètode habitual d'anàlisi de càlculs renals, així com el procediment per la presa dels espectres de les mostres. D'altra banda, s'especifiquen els fonaments dels mètodes d'anàlisi de dades emprats: Anàlisi de factors, PCA i ANN.

2.1. EQUIPS I REACTIUS

2.1.1. Equips i software

Equips:

UAB:

- Microscopi estereoscòpic, (4x), China
- Microscopi Electrònic
 - o SEM: JEOL JSM-6300, Japan
 - o EDS: Oxford Instruments Link ISIS-200, UK

Università di Roma:

- Microscopi estereoscòpic, Leica LED5000 MCI, Wetzlar, Germany.
- Mesures espectrals
 - o Cinta transportadora DV, Italy
 - o Espectròmetre ImSpector N17, Oulu, Finland
 - o Càmera Pixelvision InGaAs, Tigard, USA
- Microscopi Electrònic
 - o SEM: HITACHI S2500, Japan
 - o EDS: Kevex 8000, USA

Software:

- The Unscrambler v 9.1, Camo Process, Oslo, Norway.²⁷
- MATLAB v 7.0, MA, USA.²⁸
- TRAJAN v 3.0, Horncastle, UK.²⁹

2.1.2. Mostres

- Càlculs renals proveïts per l'Hospital Universitari de Bellvitge, BCN, Espanya.

Es van triar un total de 215 mostres de càlculs renals d'entre una col·lecció de més de 1300 mostres. Es van seleccionar mostres representatives per a cada tipus de càlcul, incloent la major variabilitat de les característiques típiques possible.

2.2. TÈCNIQUES ANALÍTIQUES

2.2.1. Microscòpia Estereoscòpica

La magnificació de la imatge de les mostres a través d'un microscopi binocular permet una visió tridimensional de la superfície de les mateixes. Aquesta visió possibilita l'observació de les característiques morfològiques i la distribució dels cristalls sobre la superfície i la part interior de les mostres.

2.2.2. Microscòpia Electrònica d'Escombrat (SEM) i Microanàlisi de Raigs X (EDS)³⁰

La tècnica SEM és emprada per obtenir imatges tant de la superfície com de l'estructura interna dels càlculs renals. D'altra banda, el microanàlisi per energia dispersiva de raigs X permet caracteritzar la composició de la superfície escombrada. La combinació d'ambdues tècniques permet caracteritzar totalment la morfologia i composició dels càlculs renals analitzats.

Per treballar amb la tècnica SEM-EDS és necessari recobrir la superfície de les mostres amb una capa prima bé de carboni grafit o bé d'or, per tal que la superfície sigui conductora i tingui una resposta suficientment intensa al feix d'electrons.

Al SEM, el feix d'electrons és produït termoionícament per una pistola d'electrons que conté un càtode de tungstè. El feix emès, que té una energia de 0,5 a 30 keV, és conduït a través de parells de lents condensadores i deflectores que el focalitzen. Finalment, el feix d'electrons és deflectat als eixos x i y per cobrir la superfície de la mostra.

Hi ha tres tipus de senyals amb la tècnica SEM: els electrons secundaris, els electrons dispersats i els raigs X emesos per la mostra.

Els primers són emesos pels àtoms de la superfície de la mostra, de manera que el contrast amb la imatge depèn de la morfologia d'aquesta superfície. Els electrons dispersats són electrons primaris que han estat reflectits per àtoms de la mostra, així que el contrast de la imatge depèn del nombre atòmic dels àtoms implicats. Els raigs X útils per l'anàlisi EDS provenen de la interacció del feix d'electrons incident amb els

àtoms de la superfície de la mostra. El feix arrenca un electró intern d'un àtom i quan aquest forat és ocupat de nou, s'emeten raigs X amb una energia única per cada àtom.

L'anàlisi EDS permet mesurar l'espectre de raigs X de la mostra, de manera que és possible detectar els pics de senyal pels elements presents a la zona escombrada. A més, també és possible fer experiments de rastreig (*mapping*) elemental sobre la superfície, podent localitzar així a quins punts de la mostra es troba cadascun dels elements detectats.

2.2.3. Hyperspectral Imaging^{20,31,32}

Els equips emprats pels estudis de *Hyperspectral Imaging* difereixen en la seva configuració en funció de les necessitats específiques de cada laboratori. L'equip utilitzat en el present estudi inclou les següents parts fonamentals (*Figura 2.1*):

- Sistema de transport de mostres. El sistema emprat compta amb una cinta transportadora controlada per software. El detector és capaç d'enregistrar només dues dimensions del *hyperspectral cube* alhora; una espacial i l'altra espectral. Es mesura l'espectre per a tots els píxels d'una sola línia de la mostra, per després formar el cub acumulant totes les línies mesurades.

- Font d'il·luminació. La mostra és il·luminada amb una làmpada halògena de 150W, posicionada amb una inclinació de 45° respecte el pla de la mostra.

- Espectròmetre NIR. Està acoblat, en el cas d'aquest estudi, a un objectiu de 50mm. El rang de treball va de 900 a 1700nm amb una resolució espectral de 7 nm, donant un total de 121 longituds d'ona mesurades. L'òptica està basada en un sistema de *Prism-Grating-Prism*, que té una alta eficiència de difracció. La longitud d'ona central passa per la part central del sistema, mentre que les properes són difractades. La disposició de l'espectròmetre, en línia amb la mostra, permet una mesura lliure d'aberracions geomètriques.

- Detector. En el cas d'aquest estudi, és una càmera InGaAs basada en un *focal plane array*, amb una resolució de 320 píxels. L'acoblament entre l'espectròmetre i el detector fa que les mesures preses a les longituds d'ona dels extrems no siguin ben enregistrades i s'hagin d'eliminar de l'anàlisi.

Aquesta configuració del sistema permet un temps d'anàlisi molt reduït i la possibilitat de mesurar diverses mostres simultàniament, sempre que el camp enregistrat per l'objectiu sigui suficient.

La resolució de les imatges obtingudes està fixada a l'eix x (el nombre de píxels del detector), mentre que a l'eix y aquesta resolució depèn de la velocitat amb què avanci la cinta transportadora de mostres. A més velocitat de la cinta, l'àrea mesurada a cada píxel és més gran, fent que la imatge obtinguda perdi definició.

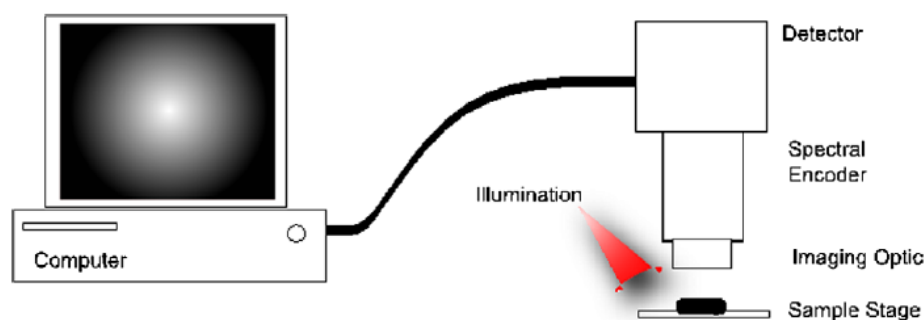


Figura 2.1. Esquema del muntatge de mesura²⁰.

Els valors de reflectància obtinguts segueixen l'Equació 2.1.

$$R = \frac{r_s - r_b}{r_w - r_b} \quad \text{Equació 2.1}$$

On r_s és el valor de reflectància directament mesurada, r_b és la reflectància mesurada pel negre (corresponent al soroll de fons) i r_w és el valor de reflectància mesurada per una mostra estàndard blanca. Els valors de r_b i r_w s'obtenen amb el calibrat de l'equip.

2.3. TÈCNiques D'ANÀLISI DE DADES³³

Les tècniques de reconeixement de pautes permeten relacionar informació física continguda a conjunts de dades multivariants amb variables químiques. Dintre d'aquestes tècniques, trobem l'anomenat *Exploratory Data Analysis*, que engloba bàsicament dos tipus d'anàlisis: Anàlisi de Factors i Anàlisi de Components Principals.

2.3.1. Anàlisi de Factors^{34,35}

L'anàlisi de Factors (FA) és una poderosa tècnica d'anàlisi multivariant que permet reduir el número de variables que defineixen un sistema. L'objectiu del FA és trobar variables "latents" (també anomenades "factors") que descriguin la variància amb sentit real, sense descriure la variància error. Per arribar a aquest punt, la tècnica es basa en la correlació de variables. Totes les variables que estiguin correlacionades es poden expressar com un únic factor.

Gràcies a aquesta capacitat, el FA permet diferenciar el nombre de components purs dintre d'una matriu de dades que inclogui diversos compostos. Pot indicar si els compostos són, *a priori*, distingibles, ja que els factors tenen sentit químic.

El FA crea una matriu d'equacions que representen el sistema, incloent les variables reals. El rang d'aquesta matriu (el nombre de files linealment independents) és equivalent al nombre de factors que representen el sistema. En funció del percentatge de variància que expliqui cada factor, se li associa un *eigenvector*, que pot

ser considerat com una mesura del pes del factor al model; valor que serà zero per a files linealment dependents de la matriu.

Hi ha diverses teories per discernir quin ha de ser el darrer factor que s'ha de considerar com a descriptor del model. Kaiser³⁶ va proposar que el límit es pot marcar al valor 1. Així, es prenen tots els factors que tinguin un *eigenvalue* ≥ 1 .

Els resultats del FA depenen de la qualitat de les dades; el FA pot no ser totalment concloent respecte el nombre de factors que defineixen el sistema. Per tant, és interessant fer també una anàlisi de components principals (PCA) sobre les dades, per analitzar totes les variables de nou.

2.3.2. Anàlisi de Components Principals^{3,33}

L'Anàlisi de Components Principals (PCA) és una de les tècniques d'anàlisi estadístic multivariant més emprades pels químics. Essencialment, la PCA és una transformació de les variables reals a unes noves coordenades ortogonals (Components Principals, PC), que té com a objectiu la reducció de les variables que defineixen un sistema, posant així de manifest relacions o estructures que no són evidents amb l'observació directa de les dades originals. La PCA transforma les variables originals, possiblement correlacionades, en unes noves variables ortogonals, fent que la matriu de dades original redueixi la seva mida. Tot aquest procediment té lloc sense una pèrdua d'informació significativa.

Les noves variables, els PC, són combinacions lineals de les variables originals, però que no corresponen a cap característica química del sistema; són unes noves variables "abstractes". El pes de cada variable original per a cada PC rep el nom de "*loading*". Cadascuna de les mostres en estudi queda representada pels valors corresponents a cada *loading*, anomenats "*scores*". Així, és possible expressar la matriu de dades original (X) en funció de les matrius de *scores* (T) i de *loadings* (P^T) segons l'Equació 2.2.

$$X = T \cdot P^T + E \quad \text{Equació 2.2}$$

on el terme E expressa l'error aleatori que contenen les dades, que inclou la variància continguda a tots els PC que no es consideren en la creació del nou model.

El procediment emprat pel mètode per determinar els nous PC segueix l'algoritme NIPALS (*Nonlinear Iterative Partial Least Squares*). Es defineix un nou vector, la direcció del qual serà la de màxima variabilitat de les dades; aquest serà el primer PC (Figura 2.2). A continuació, es fa rotar un segon vector sobre la posició de l'origen, mantenint l'ortogonalitat amb el primer, fins a trobar la direcció de màxima variabilitat de les dades. La repetició d'aquest procediment dona els diferents PC, cada cop representant un percentatge de variabilitat del sistema més petit.

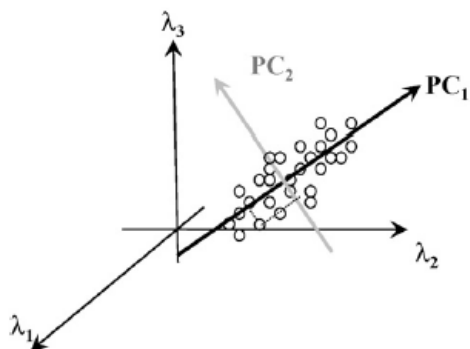


Figura 2.2. Exemple d'una representació de la variància capturada pels 2 primers components principals d'un conjunt de dades²¹.

La PCA és també útil per trobar punts anòmals (*outliers*), ja que aquests acostumen a presentar valors de *scores* diferents als de la resta del grup. L'eliminació de punts anòmals sempre és un fet compromès, ja que en eliminar-lo estem eliminant variabilitat del conjunt de dades. D'altra banda, ja que la PCA no dóna una informació definitiva respecte els punts anòmals sinó que depèn de la pròpia interpretació de les dades, cal fixar un criteri pel qual alguna regió del càlcul pugui ésser considerada anòmla i exclosa del conjunt de dades.

La informació que s'obté de la PCA és complementària a la que dóna el FA, degut al diferent procés que es segueix per la definició de les noves variables. De fet, el rang de la matriu de dades obtingut amb PCA pot no ser igual al nombre de substàncies químiques diferents al sistema, com sí que es suposa pel FA.

És habitual fer un pretractament de dades sobre la informació original. Estandarditzar les dades és un procediment comú, que consisteix a restar a cada valor de reflectància de cada variable el valor de la mitja per aquella variable i dividir-lo entre la desviació estàndard. Així es dóna la mateixa èmfasi a totes les variables.

Quan es treballa amb espectres de mostres, és una tècnica habitual aplicar la primera derivada a aquests i treballar amb aquestes dades. En aplicar la primera derivada a un espectre, estem accentuant les diferències als pendents dels espectres a punts concrets. El valor absolut de reflectància d'un espectre no aporta molta informació, ja que aquest pot definir un espectre que sigui simplement múltiple d'un altre. Això vol dir que la matriu de dades tindria, realment, dues files iguals, una d'elles multiplicada per un escalar, la qual cosa no amplia el rang de la matriu; és a dir, no representa cap component químic diferent.

Abans de fer la primera derivada dels espectres a tractar és convenient fer un pretractament de *smoothing*. Aquest consisteix a suavitzar l'espectre per eliminar el soroll del mateix, per no obtenir falsos valors de la primera derivada a zones sorolloses de l'espectre. Per fer-ho, es fan "finestres" amb un número determinat de punts de l'espectre al voltant d'un punt central i s'aplica un algorisme per suavitzar la corba. La finestra va avançant punts a l'espectre fins a completar-lo sencer. El tractament de

smoothing que es duu a terme es realitza amb l'algoritme de Savitzky-Golay, amb una finestra de 5 punts i un polinomi de segon ordre. Després que l'espectre hagi estat suavitzat es pot fer la primera derivada d'aquest. Cal tenir en compte que amb aquest pretractament es perd informació als extrems dels espectres, concretament 2 punts a cada extrem, ja que són els necessaris per poder crear la finestra al voltant d'un punt central. Per tant, no és convenient aplicar el *smoothing* amb molts punts laterals, per tal de perdre la menor quantitat d'informació possible.

2.3.3. Xarxes Neuronals Artificials²⁵

Les Xarxes Neuronals Artificials (ANN) imiten el funcionament del cervell humà adaptant qualsevol funció contínua, a diferència d'altres mètodes estadístics, que optimitzen sempre la mateixa funció.

Una ANN està estructurada en un mínim de tres capes (*Figura 2.3*): una d'entrada de dades, una de resultats finals (classificació) i un nombre variable de capes centrals. Cadascun dels nodes o "neurones" que formen les capes està relacionat amb tots els nodes de les capes inferiors a través d'uns coeficients (*weights*) determinats.

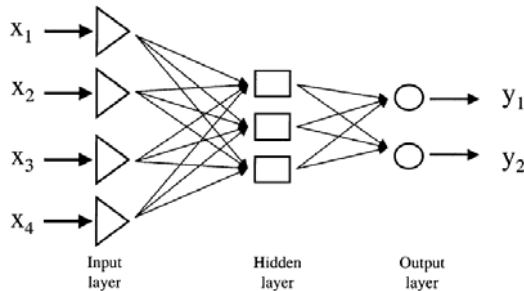


Figura 2.3. Esquema de l'estructura bàsica d'una ANN²².

L'algoritme emprat a aquest estudi és el conegut com *Back propagation*, que permet modificar els coeficients de cada connexió a través d'un procés iteratiu, per tal de minimitzar l'error de predicció. Aquests valors es modifiquen per tal de minimitzar l'error RMS (*Root Mean Square*)³⁷, com mostra l'Equació 2.3:

$$RMS = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^M (t_{ij} - y_{ij})^2}{N \times M}} \quad \text{Equació 2.3}$$

on N és el nombre de mostres predites, M és el nombre de mostres de calibració, t són els elements de la matriu d'entrada i y són els elements de la matriu de sortida. Així, per exemple, al cas d'estudi N representaria la quantitat de càlculs renals predits amb el model i M , la quantitat de càlculs emprats per les mostres de calibració.

De la mateixa manera que amb altres mètodes estadístics d'anàlisi de dades, convé triar una ANN tan simple com sigui possible per descriure el model plantejat, fet

que fa guanyar en estabilitat, però sense perdre capacitat de classificació. Així, quan el gràfic de RMS vs nombre d'iteracions mostra un valor constant, és convenient aturar el procés d'aprenentatge per tal de no sobreajustar el model.

2.3.4. Anàlisi d'imatges

El software MATLAB permet tractar les imatges provinents del *hyperspectral cube*, fent una anàlisi PCA prenent com a mostres cada píxel individual de la imatge.

Aquest programa permet crear imatges RGB (*Red-Green-Blue*) de la superfície escombrada, representant fins a 3 PC alhora. Aquestes imatges es creen amb la informació continguda als *scores*. Cadascun dels tres colors és assignat a un PC, fent que la intensitat del color corresponent a aquest PC depengui del valor del *score* associat al píxel en qüestió. La combinació dels tres colors permet crear imatges amb diferents tonalitats on els diferents components poden ser diferenciats.

2.4. PROCEDIMENT EXPERIMENTAL

2.4.1. Preparació de les mostres

El procés de selecció i preparació de mostres va ser dut a terme als laboratoris del Centre GTS, a la UAB.

Les mostres van ser tallades amb bisturí per tal d'obtenir una superfície tan llisa com fos possible de la part interna del càlcul renal, que també és la regió d'observació més important.

2.4.2. Mesura dels espectres

La mesura dels espectres de les mostres va tenir lloc als laboratoris de la Universitat di Roma, Itàlia.

Les mostres van ser analitzades subjectant-les sobre un suport plàstic que permet reduir les vibracions provinents de la cinta transportadora i mantenir la posició del càlcul estable al moviment. Un exemple de càlcul renal preparat per analitzar es mostra a la *Figura 2.4a*. Es presenta un recull de mostres a l'Annex I.

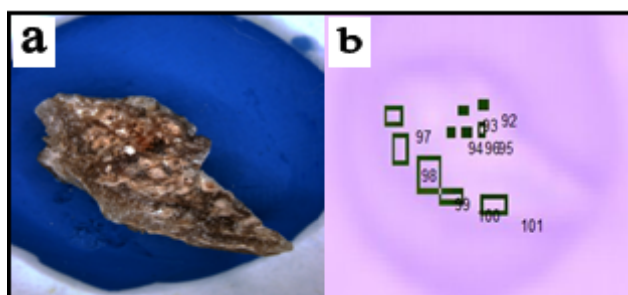


Figura 2.4. a) Imatge d'un càlcul renal b) exemple de selecció de ROI sobre la superfície d'una imatge reconstruïda.

2.4.3. Anàlisi dels espectres

El software associat al sistema de mesura permet seleccionar regions d'interès (ROI) sobre la superfície mesurada, essent la mitjana de la reflectància per als píxels de tota l'àrea seleccionada el valor que en resulta (*Figura 2.4b*). Els valors de reflectància per a les ROI seleccionades són els que s'utilitzaran per fer el tractament de dades, emprant els programes The Unscrambler i TRAJAN.

Per fer una anàlisi basada en ROI seleccionades és convenient triar àrees en lloc de píxels individuals, per evitar soroll i minimitzar salts de senyal que es poden produir entre píxels propers. Podem considerar aquesta tècnica com un *smoothing* de la superfície. Aquesta manera de suavitzar la superfície presa per fer l'anàlisi té sentit, ja que amb el tipus de mostres amb què treballem, és possible que algun píxel contingui matèria orgànica o alguna substància aliena a l'estructura del cristall.

Per tant, donat el fet que és possible seleccionar determinades ROI sobre la superfície de les mostres analitzades, es prenen 5 ROI sobre cada càlcul renal. Les àrees es prenen de manera aleatòria sobre la superfície del càlcul renal. El nombre de ROI pres permet tenir un nombre de mesures representatiu de tota la superfície, sense generar una quantitat de dades a tractar molt gran.

3. RESULTATS I DISCUSSIÓ

En aquest apartat es descriuen els resultats obtinguts seguint la seqüència de l'estudi. Així, s'exposa en primer lloc la caracterització dels càlculs seleccionats mitjançant els mètodes més convencionals emprats fins ara, per presentar seguidament els resultats obtinguts amb les noves metodologies. D'aquesta manera, es podran identificar les aportacions d'aquests mètodes.

3.1. CLASSIFICACIÓ DE CÀLCULS RENALS PER MICROSCÒPIA ESTEREOSCÒPICA

S'estudia la superfície externa de tots els càlculs renals, ja que el color i l'estructura externa del càlcul són representatius dels components que el formen. També és important la localització de dipòsits superficials d'altres compostos sobre la superfície del càlcul, que poden ser indicatius de canvis en les condicions urinàries⁶.

Els paràmetres que s'analitzen en l'estructura interna són: organització dels cristalls, color, formació de capes o altres estructures i presència d'altres compostos diferents als observats a la superfície. Cal destacar que és possible trobar altres compostos com a punts de nucleació, sobre els que s'ha desenvolupat l'estructura externa del càlcul renal. Es mostren alguns exemples a la *Figura 3.1*.



Figura 3.1. Mostres analitzades amb microscòpia estereoscòpica. D'esquerra a dreta: COM, AUA, HAP.

3.2. ANÀLISI DE CÀLCULS RENALS PER SEM

Les mostres que no es poden classificar unívocament a través de la microscòpia estereoscòpica són analitzades al SEM.

A les imatges obtingudes amb SEM s'estudien la forma i la distribució dels cristalls de la superfície, que són característics de cadascun dels compostos estudiats. La *Figura 3.2* mostra diferents exemples per alguns dels tipus de càlculs renals estudiats.

3.2.1. EDS

Amb la tècnica EDS s'han detectat pics d'elements característics de cada tipus de càlcul. A mode d'exemple, es mostra el cas de la STR, que és identificada a través de la localització de cristalls d'aquesta espècie dispersos sobre una matriu de HAP.

És necessari centrar el feix sobre un cristall pur per tal d'obtenir un espectre clar, com es mostra a la *Figura 3.3*.

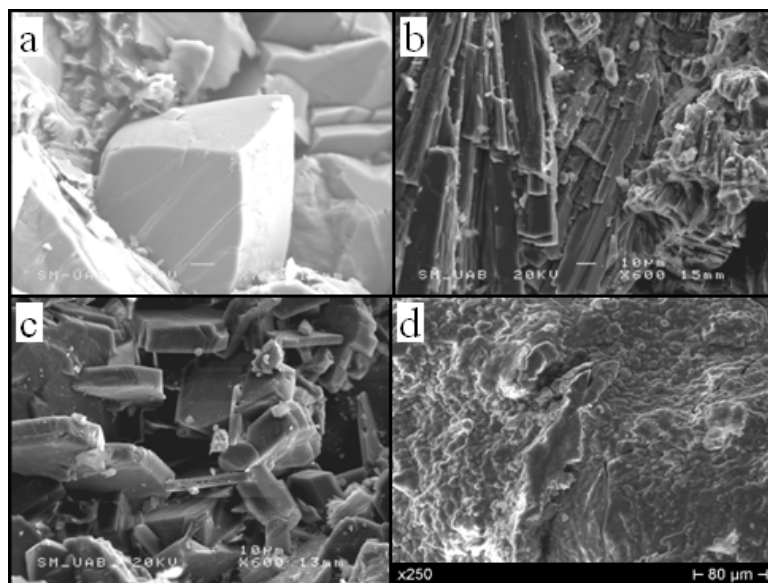


Figura 3.2. a) Cristalls bipiramidals, COD; b) Cristalls plans, BRU; c) Cristalls poc compactes, AUA; d) estructura amorfa amb petites esferes, HAP. *Imatge obtinguda al laboratori de la Universit  di Roma.*

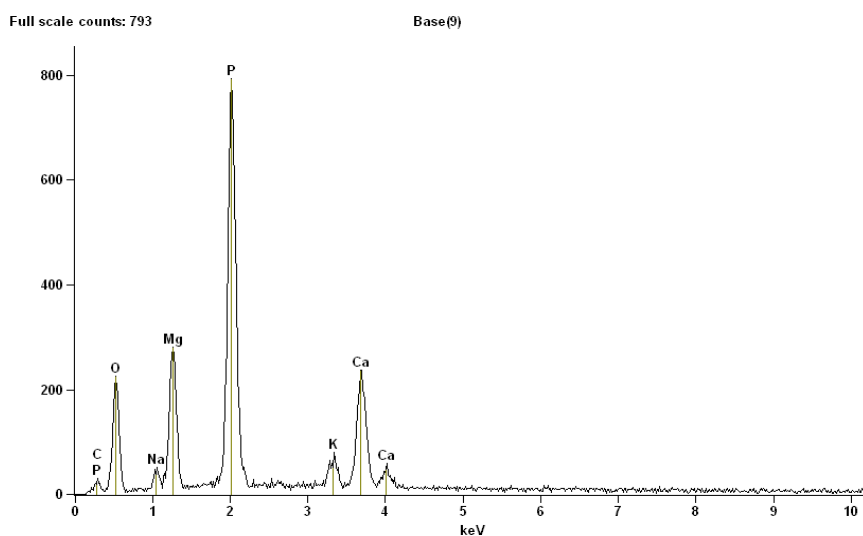


Figura 3.3. Espectre de raigs X d'un cristall de STR d'un càcul renal.

Els experiments de *mapping* mostren sobre una imatge bidimensional els píxels a on es detecten els elements seleccionats. Una imatge de la superfície del càcul mostra els cristalls que hi ha dipositats. Per a una determinació unívoca de la composició del càcul es poden tenir en compte els elements diferenciadors de cada tipus de compost. Per exemple, al cas de la STR, la presència de Mg permet definir el perfil dels cristalls, que queden diferenciats del rerefons de HAP. Aquest queda caracteritzat per l'abundància de Ca, amb buits a les posicions ocupades pels cristalls de STR, tal i com mostra la *Figura 3.4*.

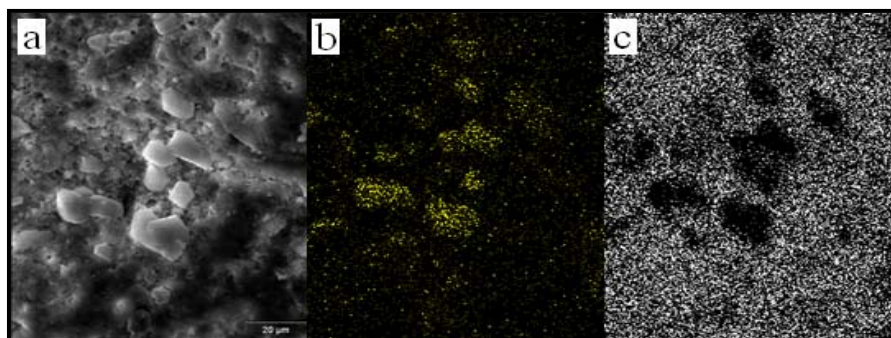
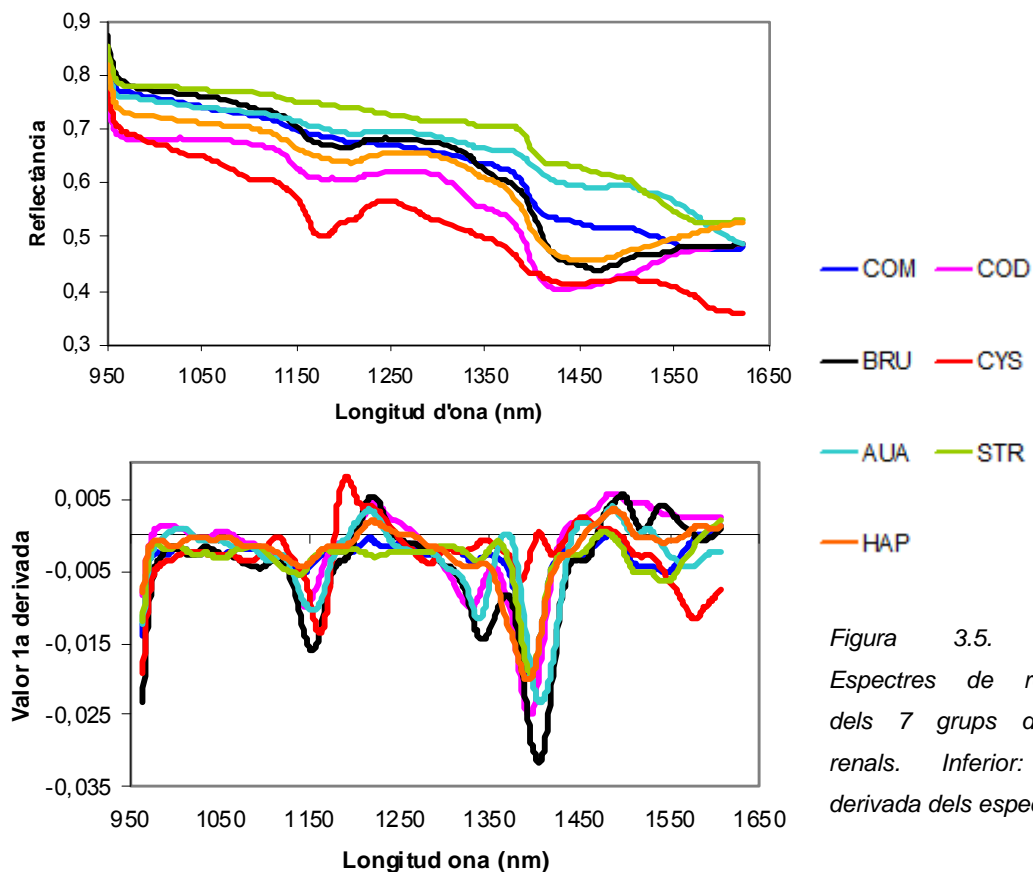


Figura 3.4. a) Imatge de cristalls de STR sobre una matriu de HAP. b) Mapping Mg. c) Mapping Ca.

3.3. HYPERSPECTRAL IMAGING

Presentem aquí tant les dades espectrals de les mostres estudiades com el tractament d'aquestes dades per els mètodes ja esmentats de FA i PCA. Les característiques de l'equipament permeten mesurar diverses mostres simultàniament i analitzar-les posteriorment de manera individual.

Els espectres mesurats, obtinguts amb la selecció d'una ROI, permeten observar diferències significatives entre els diferents components (Figura 3.5). El valor absolut de la reflectància no dóna informació per ell mateix, ja que pot dependre d'irregularitats de la superfície, que desviïn la radiació de manera aleatòria. El que sí dóna informació és la tendència que mostren els espectres a cada regió, tendència que queda reflectida calculant la primera derivada dels espectres (Figura 3.5).



3.4. ANÀLISI DE FACTORS

S'aplica el FA al conjunt de mostres que conté les 7 substàncies diferents, amb l'objectiu de comprovar si realment són distingibles, obtenint la *Figura 3.6*.

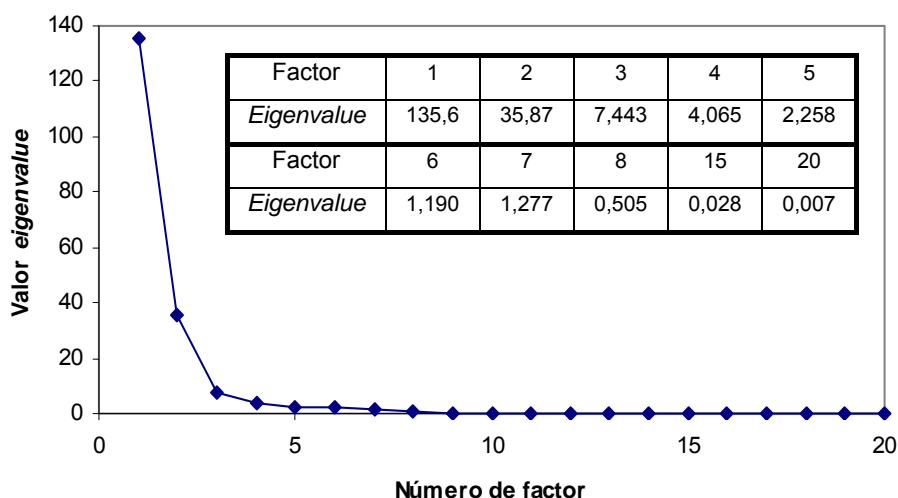


Figura 3.6. Valors dels eigenvalues obtinguts al FA.

Si observem els valors representats a la *Figura 3.6*, veiem que el darrer *eigenvalue* superior a 1 (si seguim la regla de Kaiser³⁶) és el corresponent al Factor 7. D'aquí se'n desprèn que, a través d'aquest tipus d'anàlisi, som capaços de distingir un total de 7 components químics diferents al conjunt de dades analitzat; és a dir, hi ha 7 espectres que no són cap combinació lineal dels altres. Aquest resultat correspon al nombre d'espècies químiques majoritàries existents a les mostres analitzades.

Tenint presents els resultats de FA, es proposa una anàlisi PCA més exhaustiva del mateix conjunt de mostres, per tal de classificar les mostres analitzades i, al mateix temps, reduir el nombre total de variables (en aquest cas, les longituds d'ona dels espectres), corresponents a les que tenen més contribució en la definició del sistema.

3.5. ANÀLISI DE COMPONENTS PRINCIPALS

3.5.1. Anàlisi PCA per a cada tipus de càlcul renal. Eliminació de punts anòmals

Inicialment es va dur a terme una anàlisi PCA sobre cada grup de càlculs renals, cadascun d'ells comprenent únicament un tipus de compost químic, per tal de determinar l'existència de punts anòmals.

Si tenim en compte la naturalesa biològica de les mostres, es pot pensar que, durant la fase de creixement cristal·lí, alguna substància hagi precipitat conjuntament amb la majoritària en un punt particular del càlcul renal. Així mateix, és lògic pensar que petites quantitats de matèria orgànica han pogut quedar atrapades a l'interior del càlcul renal, alterant així l'espectre del píxel on es troben.

D'altra banda, hi ha una font de variabilitat en els espectres que està relacionada fonamentalment amb la presa de la mesura. La superfície del càlcul renal no és plana, sinó que presenta nombroses irregularitats que poden fer que, en punts concrets de la mostra, la mesura de la reflectància no sigui adequada.

A continuació es mostra un exemple d'anàlisi PCA (sobre 27 mostres d'àcid úric anhidre, AUA) per a un sol tipus de càlcul renal, procediment que és aplicable a la resta de tipus. Es realitza una anàlisi PCA amb el programa "The Unscrambler" sobre 5 ROI per a cada mostra de AUA, de manera que cada ROI serà tractada com una mostra independent en aquesta part de l'anàlisi. Com a variables s'inclouen totes les longituds d'ona; un total de 97 variables. Organitzant així les dades és possible comprovar si alguna regió concreta d'una mostra és realment diferent a les altres.

Per observar la presència de punts anòmals, resulta pràctic representar gràficament els PC més importants del sistema, on veurem els scores per a cada ROI. A la *Figura 3.7* s'aprecia la distribució dels scores per a totes les ROI corresponents a les mostres de AUA. El gràfic inclou l'el·lipse coneguda com a *Hotelling T^2* . Aquesta línia mostra a quina distància del centre del model queden els scores que representen cada ROI³⁸. L'el·lipse inclou al seu interior el 95% de la variància total del model, de manera que es pot dir que els punts que queden a l'exterior de la mateixa no queden ben explicats pel model creat. Aquesta és una manera gràfica d'identificar els possibles punts anòmals inclosos al conjunt de dades.

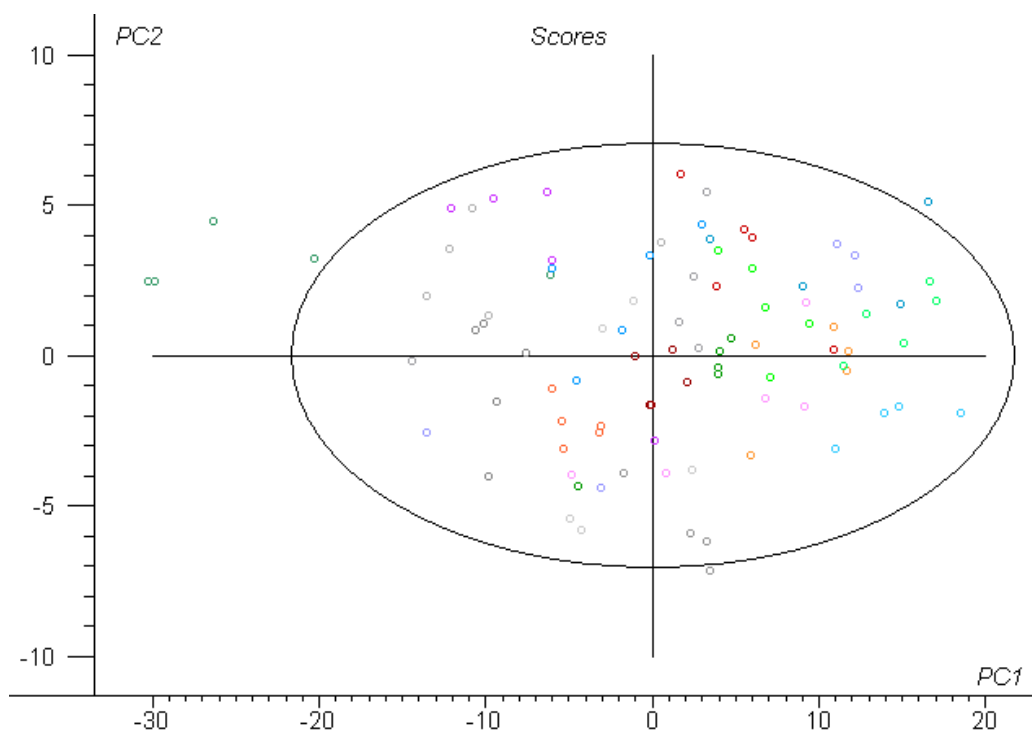


Figura 3.7. Representació dels scores per PC1 vs PC2 per les 27 mostres de AUA. Cada conjunt de 5 ROI queda representat per un color diferent.

D'aquesta manera es fa clar que els punts que queden fora de l'el·lipse amb valors negatius per a PC1, corresponents al mateix càlcul renal, mostren que aquest difereix de la resta. Per tant, eliminem aquest càlcul del model. D'altra banda, els dos punts que queden lleugerament fora de l'el·lipse amb valors positius per a PC1 són dues ROI que pertanyen a càlculs renals diferents. No és convenient eliminar-les, ja que estariem sobreajustant el model, fent que classifiqués perfectament les mostres de creació del model però no les noves mostres que intentéssim classificar.

Després de fer aquest tractament per als diferents grups de mostres, segons la seva composició química, només és necessari eliminar una mostra al cas de l'àcid úric anhidre i una mostra al cas de l'oxalat de calci monohidratat (veure Annex II).

3.5.2. Anàlisi PCA pel conjunt dels 7 tipus de càlculs renals

Un cop les dades han estat "netejaes", podem tractar-les per tal de classificar els 7 tipus de components químics dels càlculs renals, amb l'objectiu de desenvolupar un model que sigui capaç d'identificar el tipus de càlcul renal en ésser aplicat a una mostra nova, havent sofert el mateix tractament que les emprades per crear el model.

El model conté totes les variables i es comprova la seva eficiència a través del mètode de *Cross Validation*³⁹ i les dades estan estandarditzades.

Inicialment, el model es calcula directament sobre les dades de reflectància adquirides. En aquest cas, tal i com s'observa a la *Figura 3.8 Model A*, els dos primers PC són suficients per explicar el 95 % de la variabilitat del model, quedant la resta de PC amb un valor mínim.

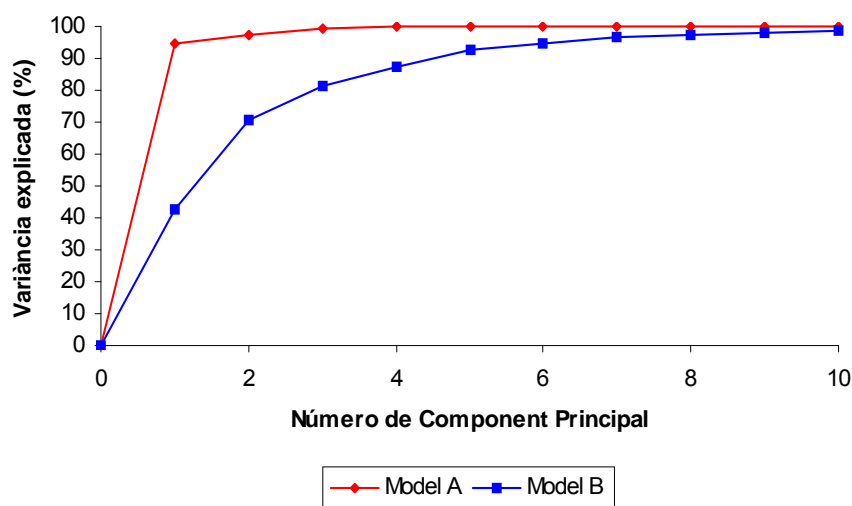


Figura 3.8. Variància del model explicada per cada PC. Model A) Dades directes de reflectància, Model B) Primera derivada dels espectres derivats.

Per tal de distribuir la variància del model d'una manera més àmplia sobre un nombre de PC més gran, es fa un pretractament de les dades originals. Al Model B de

la *Figura 3.8*, que representa els resultats d'aplicar la primera derivada a l'espectre, s'observa com aquesta aplicació permet obtenir una variància explicada per cada PC molt més distribuïda. D'aquesta forma, és necessari prendre fins al PC7 per tal d'explicar fins el 96% de la variància total del model. Tot i que les dades derivades requereixen prendre un nombre més gran de PC, aquestes tenen un poder de classificació més gran que les dades sense tractar, com s'observa al següent apartat.

D'aquests resultats es pot deduir que aplicant la primera derivada als espectres de reflectància mesurats es magnifiquen les petites diferències que hi ha entre ells.

3.5.3. Selecció de variables

L'anàlisi PCA permet reduir el nombre de variables, combinant les que són redundants i no aporten nova informació. De fet, tal i com s'observava a la *Figura 3.5*, és evident que algunes zones de l'espectre de reflectància NIR no aporten cap informació rellevant al model. Per tant, la selecció de variables és un pas important.

En escollir les longituds d'ona que tenen més "capacitat de classificació" estem reduint el soroll que aporten altres variables, al mateix temps que simplifiquem el model, fent els càlculs més senzills i ràpids.

De la definició del mètode PCA se n'extreu que cada PC és una combinació lineal de les variables originals. Per tant, és lògic pensar que no totes les variables tindran la mateixa importància dintre de cada PC, essent aquest un criteri útil per a la seva selecció. Una representació dels *loadings* per a cada PC pot donar aquesta informació, com es mostra a la *Figura 3.9*.

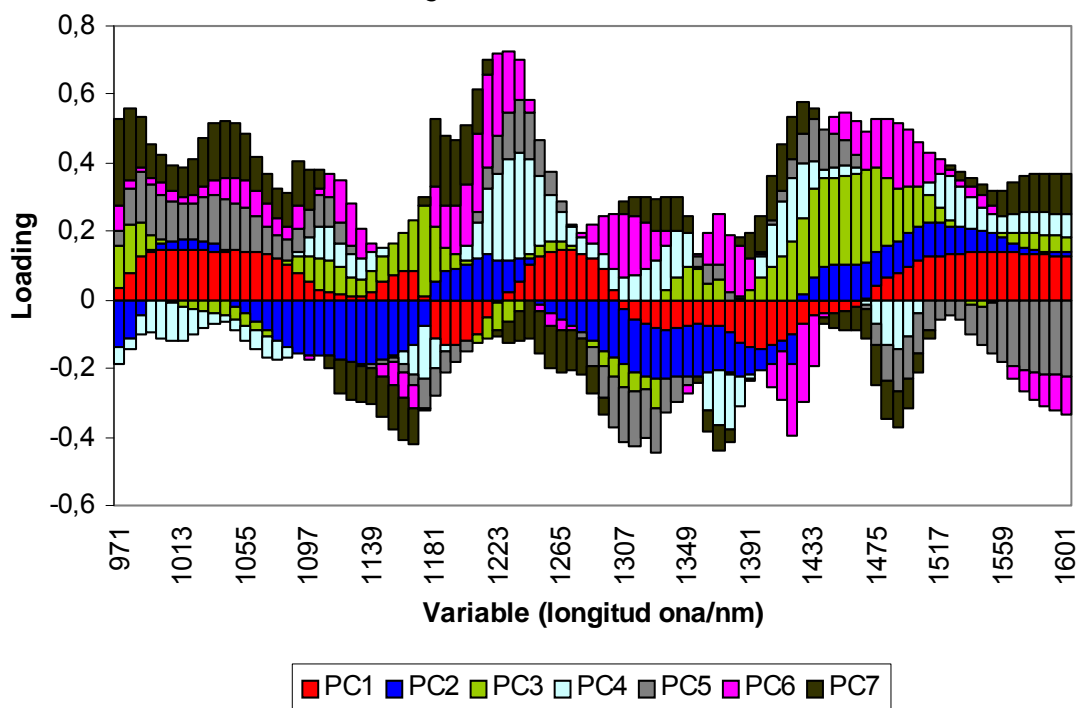


Figura 3.9. Representació dels valors dels loadings de cada variable per cadascun dels primers 7 PC.

A la *Figura 3.9* s'observa clarament quines són les variables amb més pes per cada PC, de manera que, identificant quins PC separen cada compost amb una representació adient dels *scores*, és possible determinar quines són les variables distintives de cada compost.

Com a exemple, la representació dels *scores* per PC1 vs PC2 (*Figura 3.10*), mostra que tant AUA com CYS tenen valors negatius per PC1, però queden definits per un diferent signe pel que fa a PC2.

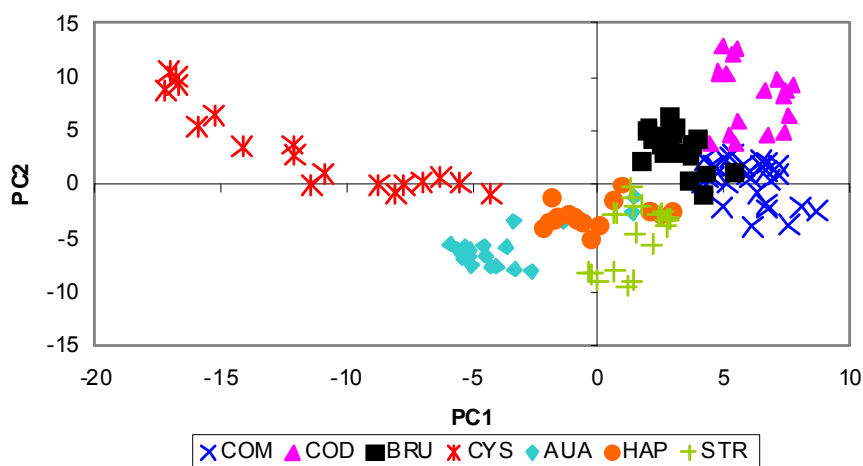


Figura 3.10. Representació dels scores per als 2 primers PC pels 7 grups de compostos.

De la *Figura 3.9* s'extreu que PC2 queda definit amb *loadings* positius per les longituds d'ona entre 1188-1230nm i 1440-1542nm. Totes corresponen a vibracions d'enllaços C-H. D'altra banda, les longituds d'ona amb *loadings* negatius per a PC2 són 971-978nm, 1083-1167nm, corresponents a la vibració Ar-OH i 1293-1384nm, que representa una zona de l'espectre de tendència diferent que a la resta de compostos, com es mostra a la *Figura 3.5*. Aquestes conclusions concorden amb l'estructura de cadascun dels dos compostos (*Figura 3.11*).

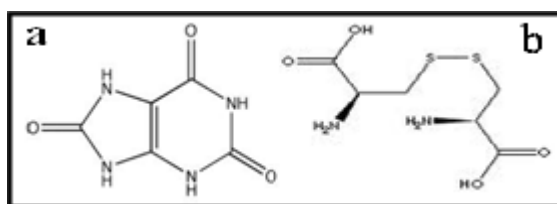


Figura 3.11. a) Estructura de l'àcid úric, b) Estructura de la cistina.

La CYS és l'únic dels compostos analitzats amb enllaços C-H, per això queda perfectament definida i diferenciada de la resta. Pel que fa a l'àcid úric, observant la seva estructura es pot apreciar que, per equilibri tautomèric, pot presentar aromaticitat, mostrant així dos grups hidroxil, que vibren a les esmentades longituds d'ona.

Podem resumir l'anàlisi de les variables per a tots els compostos a la *Taula 3.1*.

Taula 3.1. Vibracions NIR característiques per a cada tipus de càlcul renal.

Tipus càlcul renal	PC característics	λ amb major <i>loading</i> (nm)	Vibracions NIR associades
CYS	PC1<0 PC2>0	1188-1230, 1440-1542	CH, CH ₂ , CH ₃
AUA	PC1<0 PC2<0	971-978, 1083-1167	Ar-OH
COD	PC3>0 PC2>0	1426-1475	H ₂ O
COM	PC3<0 PC4>0		
BRU	PC3<0 PC4<0	1223-1244	CH
HAP	No queden ben definits		
STR			

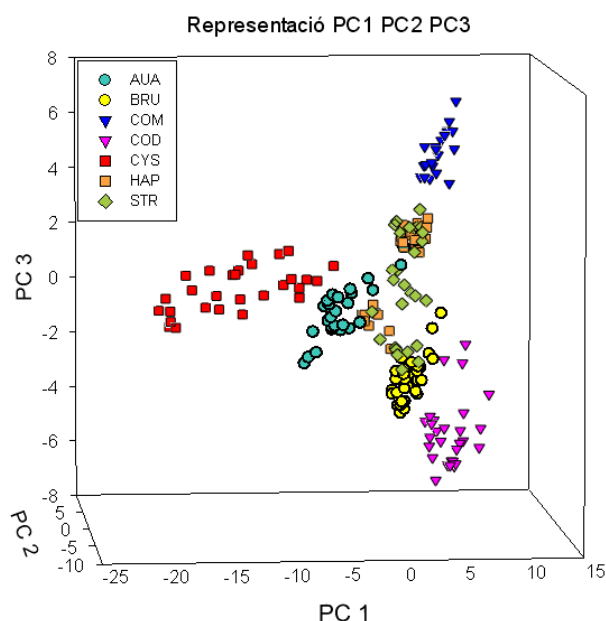
A més de les conclusions extretes per la cistina i l'àcid úric, de la *Taula 3.1* es desprèn que la vibració que permet diferenciar els dos tipus d'oxalat de calci, mono i dihidrat, és la banda de l'aigua.

D'altra banda, la brushita queda identificada per la vibració CH. És pot justificar aquest fet, en base a la considerable quantitat de matèria orgànica que contenen els càlculs renals de fosfats⁵.

L'anàlisi PCA no permet, però, distingir correctament la hidroxiapatita de l'estruvita; sempre apareixen amb *scores* similars definint un únic *cluster*. Aquest fet es pot explicar basant-nos en l'estructura del propi càlcul, ja que el component majoritari és, per ambdós, hidroxiapatita.

Tot i això, és possible definir correctament la major part de compostos, encara que grups característics com el carboxil no mostren cap banda NIR, i la vibració S-H (única per CYS) apareix a una $\lambda > 1700\text{nm}$, fora del rang mesurat experimentalment.

Resulta útil, per tant, una representació tridimensional dels *scores* per a diferents PC, fet que permet observar com són els agregats de punts que defineixen cada tipus de substància.

Figura 3.12. Representació 3D dels *scores* per a PC1, PC2 i PC3.

Com s'observa a la *Figura 3.12*, no és possible diferenciar els càlculs renals d'hidroxiapatita dels d'estruvita. Així, es proposa l'ús de ANN per tractar de classificar tots els grups.

3.6. Tractament d'imatges

D'altra banda, es va dur a terme una anàlisi PCA directament del *hyperspectral cube* (emprant píxels individuals, no ROI) amb el software MATLAB.

En aquest cas, es van analitzar directament imatges, emprant un càlcul de cadascun dels 7 tipus principals. Es fa un tractament de primera derivada sobre els espectres i les dades s'estandarditzen, de la mateixa manera que a l'apartat 3.5.2.

Com s'observava a la *Figura 3.12*, és possible separar correctament els diferents grups, exceptuant la HAP i la STR, que apareixen com a un sol núvol de punts.

Els valors dels *scores* per a cada grup de càlculs renals pot ser establert com a model al programa i identificar posteriorment mostres de composició desconeguda.

Les imatges reconstruïdes amb colors RGB van ser emprades per la identificació de mostres desconegudes. Els PC que es triïn per la representació condicionaran els colors assignats a cada tipus de càlcul renal.

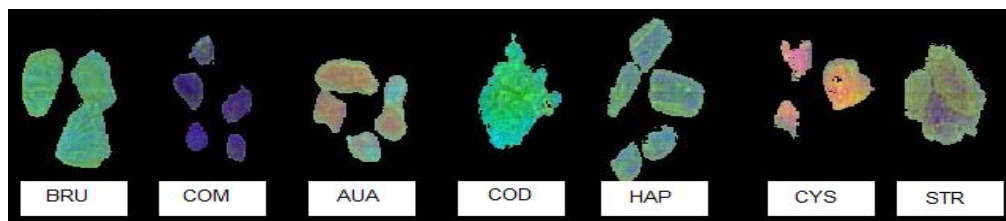


Figura 3.13. Imatge RGB dels 7 components principals de càlculs renals.

La *Figura 3.13* mostra que és possible distingir tots els compostos que formen els diferents tipus de càlculs renals en fer una representació amb el sistema de colors RGB per PC 1, PC 2 i PC 3, exceptuant HAP i STR, que mostren colors similars. S'escullen aquests tres PC perquè permeten una visió diferenciada dels diferents tipus de càlculs renals; una altra combinació donaria tonalitats diferents. Aquests resultats són equivalents a la *Figura 3.12*.

El software permet seleccionar grups de píxels al gràfic de *scores*, ressaltant-los a la imatge reconstruïda del càlcul renal. Aquesta aplicació permet identificar els núvols de punts corresponents a cada compost del càlcul renal.

Com a exemple, s'inclou la *Figura 3.14*, que representa els valors de *scores* per a PC 1 i PC 3 per una mostra que presenta principalment COM i COD.

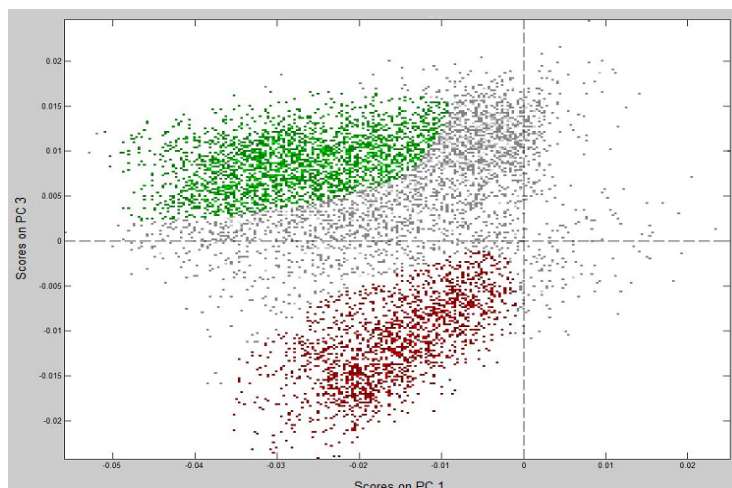


Figura 3.14. Representació de scores per a PC 1 i PC 3. Verd: COD, vermell: COM.

A més d'assignar la zona que correspon purament a COD i COM, és possible distingir una quantitat important de píxels entre les dues àrees anteriors, que podem atribuir a píxels que contenen COD en transformació.

Selecció per separat els grups de píxels que pertanyen a cadascunes de les substàncies comentades es pot obtenir un mapa de distribució de components com el que mostra la Figura 3.15. Els píxels ressaltats en color rosa mostren la diferenciació de les zones de COM i COD al càlcul, essent també possible identificar una zona de transformació de COD a COM entre les dues anteriors.

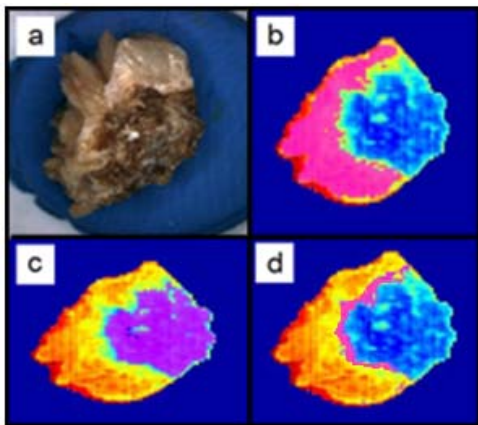


Figura 3.15. a) Imatge del càlcul renal, b) ressaltat en color rosa el COD, c) ressaltat el COM, d) ressaltat el TRA.

3.7. XARXES NEURONALS ARTIFICIALS

3.7.1. Optimització de la ANN

A l'apartat anterior s'ha vist que els millors resultats s'obtenen quan s'aplica els pretractaments de *smoothing* i primera derivada a les dades de reflectància. Aquestes són, per tant, les dades que s'utilitzen per dur a terme l'anàlisi de les dades amb ANN, emprant el programa TRAJAN, ja esmentat.

Les dades de les 5 ROI per a cada càlcul inclouen un nombre de longituds d'ona determinat. Inicialment es seleccionen 50 longituds d'ona, corresponents a les que

tenen valors de *loadings* més alts, és a dir, el nombre de variables per a cada mostra serà de $5 \times 50 = 250$. S'analitzen les 140 mostres que representen els 7 grups principals de càlculs renals.

La ANN a optimitzar és, per tant, (inputs, nombre de nodes a la *hidden layer*, outputs) = (140, n, 7), on inputs representa el nombre de mostres introduïdes i outputs representa el nombre de classes de càlculs renals. El valor dels outputs és una sola variable, que pot prendre fins a 7 valors nominals diferents.

L'optimització es fa seguint la minimització de l'error RMS (*Equació 2.3*) en funció del nombre de nodes a la *hidden layer*. El mètode per validar la nova ANN que es crea és *Cross Validation*, procediment pel qual cada mostra és eliminada individualment del model i verificada amb el model creat amb la resta de casos..

La *Figura 3.16a* mostra un exemple del procés que segueix el model per arribar a convergir al mínim d'error.

D'altra banda, la *Figura 3.16b* mostra com, el fet d'anar afegint consecutivament més nodes a la *hidden layer* de la ANN, fa que el RMS disminueixi, fins que s'arriba a 4 nodes. A partir d'aquest punt, el RMS no disminueix significativament; és a dir, el model no té un error més petit i no millora la classificació. No és convenient prendre més nodes dels necessaris per evitar el sobreajustament del model. Aquest és l'ajust excessiu del model a les dades de calibració, que fa que mostres lleugerament diferents a aquestes no quedin ben classificades pel model.

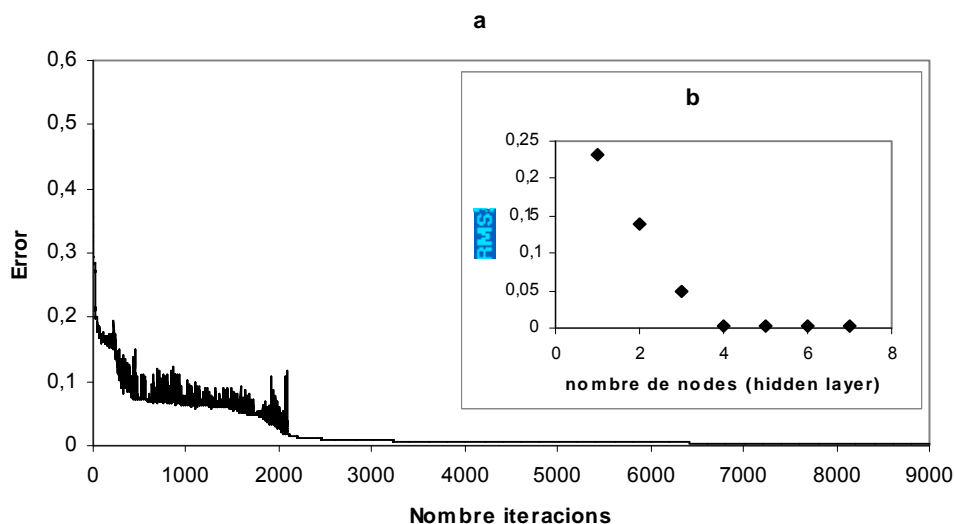


Figura 3.16. a) Exemple de gràfic pel procés d'iteracions, b) RMS vs nombre de nodes a la *hidden layer*.

3.7.2. Resultats del model

Finalment es pren una ANN amb quatre nodes a la *hidden layer* i una sola variable output (140, 4, 7), representada per l'esquema de la *Figura 3.17*.

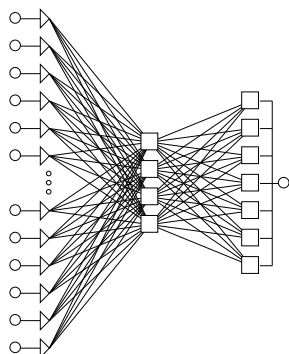


Figura 3.17. Arquitectura òptima de la ANN (140, 4, 7).

Amb aquestes condicions, el model creat s'aplica per tal de classificar les 140 mostres en estudi. El resultat, que és validat amb *Cross-validation*, indica un 100% d'encert.

Com a darrer pas, es redueix el nombre de longituds d'ona de 50 a 30 (seguint el criteri de valors de *loadings* més alts), per crear una nova ANN mantenint l'estructura (140, 4, 7). El model classifica igualment les mostres amb un 100% d'eficiència.

Un nombre inferior de variables no dona uns resultats millors al 95%, pel que es decideix adoptar el model més efectiu trobat: 30 longituds d'ona.

3.7.3. Ampliació del model a 11 tipus de càlculs renals

El model presentat a l'apartat anterior es considera apte per classificar els càlculs renals monocomponents, tot i que no contempla càlculs que siguin mesclades. Per això es proposa un model per intentar classificar els 11 tipus diferents de càlculs renals coneguts, afegint 4 nous tipus als ja existents al model: AUD, MXC, MXD i TRA.

En aquest cas es prenen 50 longituds d'ona i s'optimitza una ANN que, tot seguint el procediment anterior, s'obtenen 13 nodes a la *hidden layer*, resultant doncs una estructura (215, 13, 11). En aquest cas, el major percentatge de classificació que s'aconsegueix és del 93%.

Així, podem concloure que les ANN han demostrat ésser aptes per classificar els 7 components bàsics que formen els càlculs renals amb una eficàcia d'un 100%.

D'altra banda, amb una eficiència superior al 90%, permeten també classificar càlculs que no estan formats per un sol component.

Actualment, la manera de classificar els càlculs inclou la microscòpia estereoscòpica, tècnica que té una marcada dependència de l'habilitat de l'operador. D'altra banda, els mètodes IR i SEM resulten més laboriosos i, al cas del SEM, molt més costosos. Aquests resultats representen, per tant, avantatges clars respecte les tècniques habituals, ja que el mètode desenvolupat ofereix robustesa, rapidesa, independència de l'operador i economia d'anàlisi.

5. CONCLUSIONS

Els resultats exposats en aquest treball es poden resumir en les següents conclusions:

1. La tècnica SEM permet una anàlisi definitiva i exhaustiva de la mostra, per bé que requereix una quantitat de temps molt més gran que els nous mètodes desenvolupats en aquest estudi, degut al pretractament de la mostra (metal·litzat). D'altra banda, els requeriments econòmics són majors que amb la tècnica proposada.
2. L'Anàlisi de Factors ha demostrat ser apte per distingir el nombre de diferents components del sistema, essent una eina útil per a realitzar un estudi inicial que indiqui la possibilitat d'anàlisis posteriors per classificar les mostres.
3. L'Anàlisi de Components Principals permet "netejar" les dades inicials, i demostra que és necessari fer pretractaments (*smoothing* i primera derivada) sobre elles per tal de poder distingir correctament els diferents grups de càlculs renals.
4. És possible determinar quines són les longituds d'ona d'absorció a l'espectre NIR que permeten caracteritzar unívocament els 7 components principals a la formació de càlculs renals a través de l'estudi dels *loadings* del model PCA descrit.
5. L'estudi dels *hyperspectral cubes* amb tècniques de tractament d'imatge (MATLAB) permeten reconèixer zones de diferent composició als càlculs renals estudiats.
6. A través d'un model desenvolupat per Xarxes Neuronals Artificials ha estat possible classificar els 7 grups principals de càlculs renals, amb un 100% d'eficiència, les 140 mostres utilitzades per al seu desenvolupament.
7. També a través de les ANN ha estat possible classificar mostres de càlculs renals que contenen barreges de diferents components amb un percentatge d'eficiència superior al 90%.
8. Es podria plantejar l'aplicació del model desenvolupat a la pràctica mèdica de rutina, amb la utilització d'instruments de mesura de reflectància comercials adaptats a les condicions de treball d'un centre mèdic. Aquesta possible aplicació permetria una determinació immediata de la naturalesa del càlcul renal, proporcionant un diagnòstic sense demores de temps per el pacient.

Possibles treballs futurs

Els resultats presentats en aquest treball presenten una visió de la caracterització de les espècies que formen part dels càlculs renals. Per a la caracterització d'aquestes

espècies químiques, seria també possible aplicar altres tècniques espectrals, que poden aportar nous coneixements per la descripció dels càlculs.

5. BIBLIOGRAFIA

1. J. Botella García. *Manual de Nefrología Clínica*. Masson, Barcelona. 2002.
2. V. Lorenzo, A. Torres, D. Hernández, J.C. Ayus. *Manual de Nefrología*. 2a Edición. Elsevier España, Madrid. 2002.
3. Muñoz, J. A., Tesi doctoral, *Litiasis renal oxalocálcica*. Universitat Autònoma de Barcelona, 2004
4. Berg, W., Gayde, S., Huschke, T., et al. *13th European Symposium on Urolithiasis*, Como. 2009.
5. Grases, F., Schönel, O., Vilacampa, A. I., et.al. *Clinica Chimica Acta*, **1996**, 244, 45-67.
6. Basavaraj, D. R., Biyani, C. S., Browing, A. J., et.al. *EAU-EBU Update Series*, **2007**, 5, 126-136.
7. Grases, F., Costa-Bauzá, A., Ramis, M., et.al. *Clinica Chimica Acta*, **2002**, 322, 29-36.
8. Daudon M. et al. *Scanning Microscopy*, **1993**, 7, 1081
9. Skrtic D. et al. *Journal of Crystal Growth*, **1987**, 80, 113.
10. Wei-Dong Sun. et.al. *Research in Veterinary Science*, **2010**, 88, 461-466.
11. Grases, F., Villacampa, A. I., Costa-Bauzá, A. et.al. *Clinica Chimica Acta*, **2000**, 302, 89-104.
12. Purohit, R. S., Stoller M.L. *Urology*, **2003**, 3, 62.
13. Nayir, A. *Pediatric Nephrology*, **2002**, 17, 425-432.
14. Lehmann, C. A., McClure, G. L., Smolens, I., *Clinica Chimica Acta*, **1988**, 173 (2), 107-116.
15. Skoog, D. A, Holler, F. J, Nieman, T. A. *Principios de Análisis Instrumental*. 5ª Edición. Mc Graw Hill, Madrid. 2001.
16. Peuchant, E., Heches, X., Sess, D., et al. *Clinica Chimica Acta*, **1992**, 205 (1), 19-30.
17. Molecular Biometrics, <http://www.molecularbiometrics.com/instrumentation.html>
Data de consulta: 05/08/10
18. Bonifazi, G., Serranti, S. *Waste Management*. **2006**. 26 (6), 627-639.
19. Amigo, J. M., Cruz, J., Bautista, M., et al. *Trends in Analytical Chemistry*, **2008**, 27 (8), 696-713.
20. Gowen, A. A., O'Donnell, C. P., Cullen, P. J., et al. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **2008**, 69, 10-22.

21. Gendrin, C., Roggo, Y., Collet, C. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2008**, 48, 533-553.

-
22. Agatonovic-Kustrin, S., Beresford, R. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2000**, 22, 717-727.
23. Wei, J. T., Zhang, Z., Barnhill, S. D., *Urology*, **1998**, 52 (2), 161-172.
24. Rosenblatt, F. *Psychological Review*, **1958**, 65 (6), 386-408.
25. Lisboa, P. J., Ifeachor, E. C., Szczepaniak, P. S., *Artificial Neural Networks in Biomedicine*, Springer, London, 2000.
26. Stamey, T. A., Barnhill S. D., Zhang, Z. *et al. Journal of Urology*, **1996**, 155, 436.
27. Multivariate Data Analysis & Statistical Software Products and Solutions: The Unscrambler, <http://www.camo.com/products/index.html>
Data de consulta: 15/08/10
28. The MathWorks – MATLAB and Simulink for Technical Computing,
<http://www.mathworks.com/>
Data de consulta: 15/08/10
29. Trajan Software Ltd., <http://www.trajan-software.demon.co.uk/>
Data de consulta: 31/08/10
30. Goodhew, P. T., Humphreys, J., Beanland, R., *Electron Microscopy and Analysis*. 3rd Edition. Taylor & Francis. London. 2001.
31. Koehler, F. W., Lee, E., Kidder, L. H., *et al. Spectroscopy Europe*, **2002**, 14
32. Bonifazi, G., Menesatti, P., Millozza, M., *PITTCON 2009*, Chicago, Illinois, USA.
33. Brereton, R. G., *Applied Chemometrics for Scientists*. Wiley. England. 2007.
34. Kessler, C. J., Porter, T. H., Firth, D. *et al. Atmospheric Environment*, **1992**, 26 (6), 1137-1146.
35. Velicer, W. F., Jackson, D. N., *Multivariate Behavioral Research*, **1990**, 25 (1), 1-28.
36. Arruda, J. E., Weiler, M. D., Valentino, D. *et al. International Journal of Psychophysiology*, **1996**, 23, 63-81.
37. Havel, J., Lubal, P., Farková, M. *Polyhedron*, **2002**, 21, 1375-1348.
38. George, J. P., Chen, Z., Shaw, P., *World Academy of Science, Engineering and Technology*, **2009**, 50, 970-975.
39. Cawley, G.C., Talbot, N.L., *Neural Networks*, **2004**, 17, 1467-1475.

ANNEX I. EXEMPLES D'IMATGES DELS CÀLCULS RENALS ANALITZATS

Fotografies de càlculs renals, tal i com han estat analitzats als laboratoris de la Universitat di Roma.

AUA

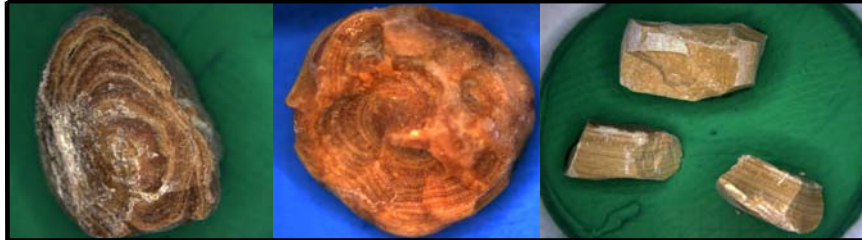


Figura 1. Càlculs renal del tipus AUA, amb estructura compacta organitzada en capes.

AUD

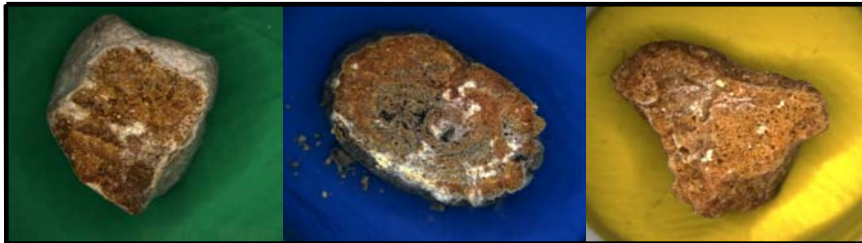


Figura 2. Càlculs renals del tipus AUD. L'estructura és molt menys compacta que al cas del tipus AUA, ja que amb la transformació es perd l'estructura inicial.

BRU

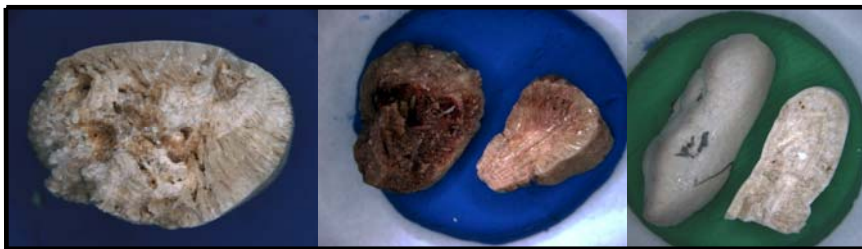


Figura 3. Càlculs renals del tipus BRU. Es poden apreciar els cristalls plans i allargats de brushita.

COM



Figura 4. Càlculs renals del tipus COM. Estructura molt compacta organitzada en capes. El càlcul en posició central és papil·lar; té un punt clar d'ancoratge a la papil·la renal, des d'on s'inicia el creixement cristal·lí.

COD

Figura 5. Càlculs renals del tipus COD. L'exemple de la dreta representa un càlcul amb interior de COM, però recobert per una capa de COD.

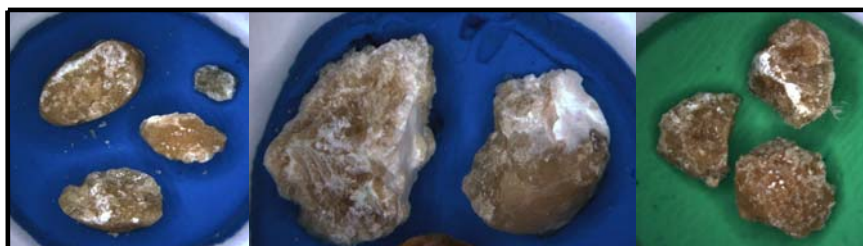
CYS

Figura 6. Càlculs renals del tipus CYS. Es caracteritzen per un aspecte de cera.

HAP

Figura 7. Càlculs renals del tipus HAP. No tenen cap estructura definida.

MXC

Figura 8. Càlculs renals del tipus MXC. Es poden apreciar les capes alternades de COD i HAP.

MXD

Figura 9. Càlculs renals del tipus MXD. Les regions de CaOx i de HAP no formen cap estructura, i la proporció de cadascun varia entre diferents càlculs renals.

STR

Figura 10. Càlculs renals del tipus STR. El seu aspecte és similar als de HAP, és necessària una gran magnificació per poder apreciar les regions que contenen cristalls d'estrúvita.

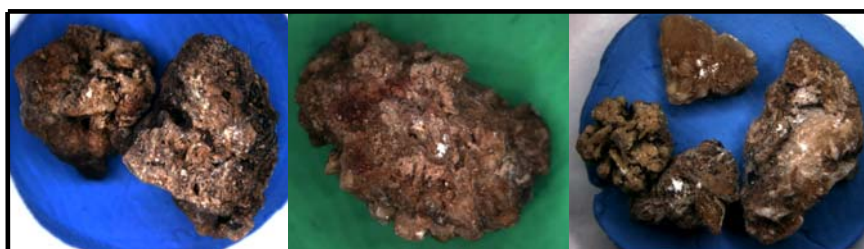
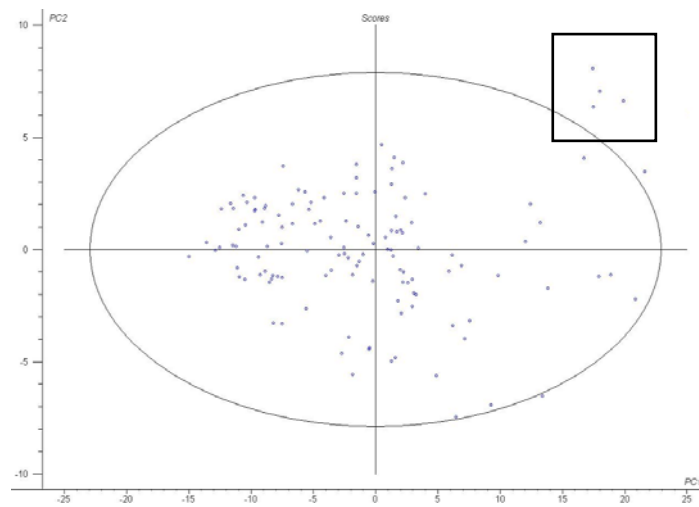
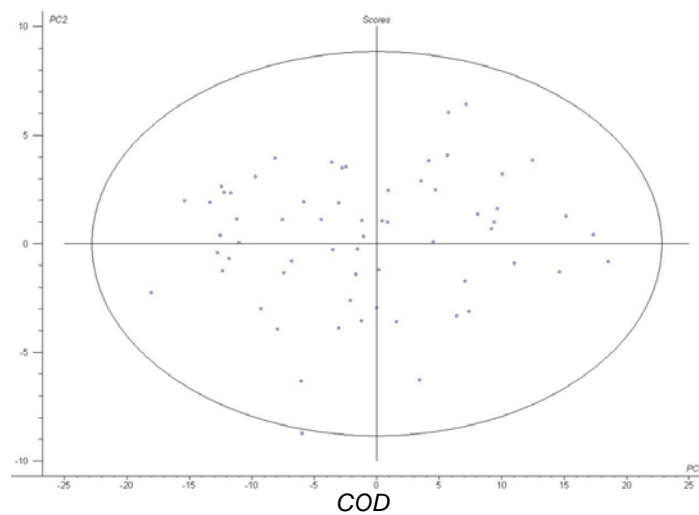
TRA

Figura 11. Càlculs renals del tipus TRA. L'estructura és poc compacta, com succeeix amb els càlculs de AUD, degut a la transformació del COD a COM. Aquest canvi és gradual, de manera que es poden trobar regions del càlcul que continguin la forma dihidratada del CaOx, mentre que altres siguin COM, sempre menys compacte que als càlculs purs.

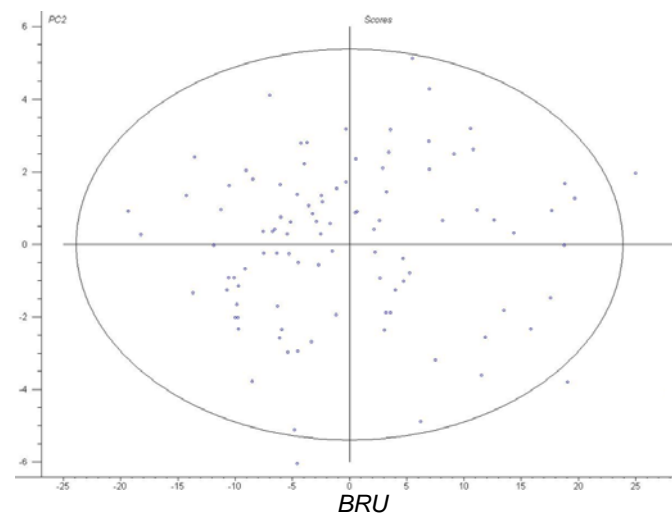
ANNEX II. REPRESENTACIONS DELS RESULTATS DE PCA SOBRE CADA TIPUS DE CÀLCUL RENAL, PER LA DETECCIÓ DE PUNTS ANÒMALS



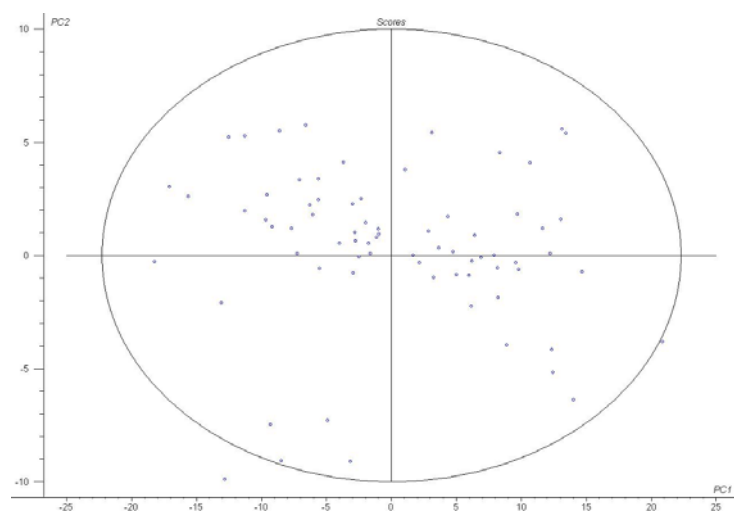
COM. El requadre ressalta les ROI que queden fora de l'el·lipse ($Hotelling T^2$). Totes corresponen a una mateixa mostra, de manera que s'elimina.



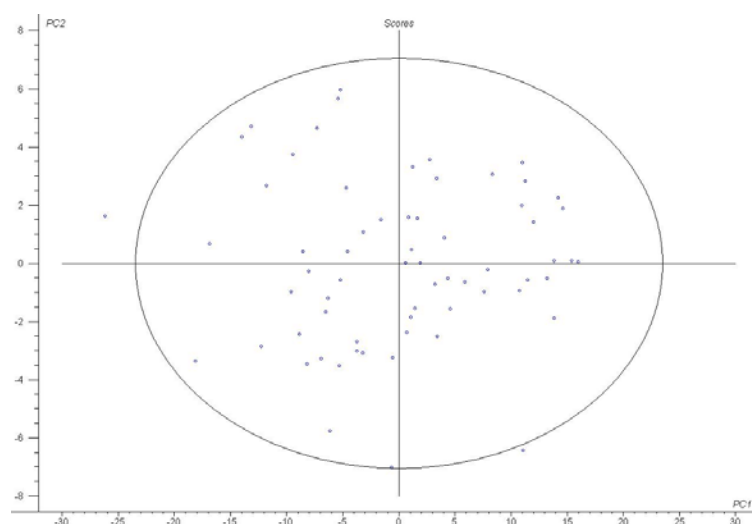
COD



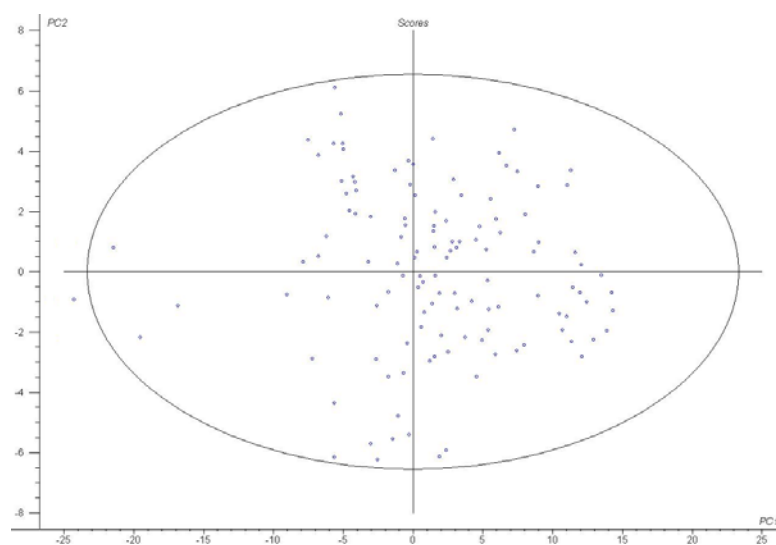
BRU



CYS



HAP



STR

